

プリオン病の神経変性機構の解析および
治療薬の開発に向けた基礎的研究
(Analysis of neurodegenerative mechanisms of prion
disease and basic research for the development of
therapeutic agents)

2023年2月

麻布大学大学院 獣医学研究科

獣医学専攻 博士課程

動物機能構造学 生体機能学 獣医生化学

DV1902 清水 琢音

<論文要旨>

プリオン病はヒトを含む多くの哺乳類が罹患する致死的な神経変性疾患である。ヒトのプリオン病は 3 つの型に大別され、孤発性/特発性のクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD)、ゲルストマン・ストロイスラー・シャンカー病や致死性家族性不眠病などの PrP をコードする遺伝子の遺伝的な変異に起因した遺伝性のプリオン病、牛のプリオン病 (狂牛病) に汚染された牛肉の喫食に起因した変異型 CJD に大別される。なかでも孤発性 CJD は最も一般的であり、プリオン病患者の 80%を占め、100 万人に約 1-1.5 人の割合で発症することが知られている。プリオンタンパク質 (PrP) はプリオン病の病因タンパク質であり、正常型プリオンタンパク質 (PrP^C) の異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) への高次構造変換により発症が惹起されると考えられている。PrP は分泌系のタンパク質に属し、アミノ末端側に小胞体への移行配列、カルボキシ末端側に GPI アンカー付加配列をもち、細胞膜上の脂質ラフトに局在する。さらに細胞膜上に局在した PrP はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、リソソーム中の分解酵素による分解を受ける。プリオン病の神経変性機構の解明を目的として、PrP の生理的な機能の解析が進み、細胞内シグナル伝達や抗酸化ストレスの制御、概日リズムの調節に参与していることが明らかとなった。しかしながら高次構造変換を通じた PrP の正常な生理学的な機能の喪失、または新たな機能獲得のいずれが神経変性の要因となり得るのかということを含め、プリオン病の神経変性機構は詳細に明らかとなっていない。また、PrP の高次構造変換はプリオン病の病因となることから、PrP^{Sc} の産生抑制と分解の亢進を標的とした化合物が同定されてきたものの、薬剤耐性を持ったプリオン株の発生が薬剤の効果を減弱させ、今日において臨床的に十分な効果が得られた治療薬が存在しない。そこで本研究では、プリオン病の神経変性機構の解明を目的とし、第一章では神経変性疾患の病因タンパク質のミトコンドリアへの異所性の局在が神経変性の要因となり得ることが報告されていることを踏まえ、PrP のミトコンドリアへの標的化および神経変

性機構の解析を行った。また第二章では、プリオン病の新規治療薬の開発を目的とし、PrP の高次構造変換が疾患の発症要因であることから、強い α -ヘリックス誘導活性を有することが報告されているヘキサフルオロ-2-プロパノール (HFIP) のプリオン病治療薬への応用を目的とした基礎的検討を行った。

第一章: プリオン病におけるプリオンタンパク質のミトコンドリアへの標的化と神経変性機構の解析

神経細胞におけるエネルギー不全是細胞障害と変性を引き起こすため、多くの神経変性疾患の発症や進行にミトコンドリアが関与することが報告されている。神経変性疾患の病因タンパク質のミトコンドリアへの異所性の局在に起因した神経変性が報告されており、プリオン病においても PrP 遺伝子の遺伝的な変異は PrP をミトコンドリアに局在させ、神経変性を引き起こすことが報告されている。また、健康なマウスでも PrP の一部がミトコンドリアに局在することも報告されている。しかしながらこれらの報告の一方で、分泌系タンパク質である PrP がいかにしてミトコンドリアに局在するのかについては明らかでない。そこで第一章では、PrP のアミノ酸配列中のミトコンドリア配列およびミトコンドリアへの標的化に関与する因子の同定を通じて、PrP のミトコンドリアへの標的化機構を明らかとすることを目的とした。さらに培養細胞を用いた PrP のミトコンドリアへの標的化系の構築を通じて、PrP のミトコンドリアへの局在が細胞機能へ及ぼす影響を解析した。PrP のミトコンドリアへの局在に関与する配列を同定するため、GFP と融合させた様々な長さのマウス PrP のトランケートを構築し、細胞内局在を観察したところ、PrP の分子中央付近の 122-139 番目までのアミノ酸がミトコンドリアへの局在に関与することを明らかとした。PrP が局在したミトコンドリアの細胞内局在は非神経細胞である HeLa 細胞では正常であったのに対し、マウス神経芽細胞腫由来 Neuro 2a (N2a) 細胞では正常な細胞内分布を失い、核の周囲に集積した。また、HeLa 細胞において PrP は膜間腔および内膜近傍に局在していたのに対し、N2a 細

胞では膜間腔および内膜近傍に加えて外膜にも局在していた。また、ミトコンドリア外膜上の Tom70 ならびに細胞質の 14-3-3 γ および η は PrP のミトコンドリアへの局在に必須であった。加えて 14-3-3 ζ はミトコンドリアの核周囲の集積体の形成に必須であった。以上の結果から PrP はミトコンドリア局在配列、14-3-3 γ および η 、Tom70 を介してミトコンドリアに標的化し、神経細胞特異的にミトコンドリア外膜に局在した PrP は 14-3-3 ζ 依存的にミトコンドリアの正常な細胞内分布を破壊させることが示唆された。軸索はシグナル伝達等で多量の ATP を必要とすることから、神経細胞特異的な軸索末端のミトコンドリア供給不全は軸索の退縮を引き起こし、プリオン病の神経変性の要因となり得ることが示唆された。

第二章: 吸入麻酔薬前駆体ヘキサフルオロ-2-プロパノールのプリオン病治療薬への応用に向けた基礎的研究

プリオン病は何らかの理由で PrP^C が PrP^{Sc} に構造変換し、中枢神経系に蓄積することで発症が惹起されると考えられている。PrP^{Sc} の蓄積が発症の要因となることから、PrP^{Sc} の産生阻害を目的とした様々な薬剤がプリオン病治療薬として検討されてきた。しかしながら薬剤の継続的な投与がもたらす、薬剤耐性を有したプリオン株の出現が治療効果を減弱させ、今日において臨床的に十分な効果が得られた治療薬が存在しない。

セボフルランは酸ハロゲン化物に代謝されないため、副作用が少なく、臨床的に広く用いられる吸入麻酔薬である。フッ素系アルコールであるヘキサフルオロ-2-プロパノール (HFIP) はセボフルランの前駆体である。HFIP をはじめとしたフッ素アルコールはタンパク質の β -シート構造を破壊し、 α -ヘリックス構造を誘導する性質からアミロイド β (A β) ペプチドのようなペプチド凝集体を溶解する溶媒として用いられている。プリオン病の治療薬として PrP^C から PrP^{Sc} への構造変換を阻害する化合物の同定が試みられているが、上述のとおりこれらの薬剤は継続的な投与により薬剤耐性を持ったプリオン株が生じてしまうことが問題であった。一方で HFIP は強固な α -ヘリックス誘

導活性を有するため、PrP^{Sc}をPrP^Cへと誘導し、PrP^{Sc}そのものの構造を正常化することが可能と考えられる。以上を踏まえて第二章では、HFIPのプリオン病治療薬としての可能性を、組換えPrPおよびプリオン病の*in vitro*のモデルとして確立されているスクレイピー持続感染マウス神経芽細胞腫由来細胞株(ScN2a)を用いたアッセイ系にて検討した。

組換えタンパク質より作成したPrP線維にHFIPを添加した時の形態を透過型電子顕微鏡で観察したところ、10 mMのHFIPの添加は線維構造を分岐した三叉の構造に変化させた。さらに20 mMのHFIPの添加は線維構造を消失させ、規則構造を持たないアモルファス様の凝集体を形成させた。一方でアミロイド β (Amyloid β : A β) (1-40)線維へのHFIPの添加は、線維構造を変化させないものの、濃度依存的に線維どうしの会合を促進させた。また、円二色性スペクトルの測定により、HFIPはA β (1-40)と比較しPrPに対して強い α -ヘリックス誘導活性を有することを明らかとした。さらにScN2a細胞にHFIPを添加し、プロテアーゼ抵抗性を検出したところ、15 mM以上のHFIPの添加はPrPのプロテアーゼ抵抗性を有意に減弱させた。また、ScN2a細胞はN2a細胞と比較してHFIPの添加により有意に低い細胞生存率を示した。以上の結果から、HFIPのPrPに対する強い α -ヘリックス誘導活性とPrP^{Sc}を持った細胞への強い細胞毒性を確認した。安全域の狭さや、PrPの基質特異性の問題など治療薬としての実用化に向けて課題があるもののPrP^{Sc}からPrP^Cへの誘導を目的としたHFIPのプリオン病治療薬としての作用機序はこれまでに開発が進められてきた治療薬にはない新規のアプローチであり、HFIPを含めたフッ素化合物がプリオン病治療薬となり得る可能性が示唆された。

<Abstract>

Prion diseases are a group of fatal neurodegenerative disorders affecting numerous mammalian species, including humans. Human prion diseases are mainly classified into three types, sporadic Creutzfeldt-Jacob Disease (sCJD), genetical prion disease in which a gene encoding Prion protein (PrP) is mutated such as Gerstmann-Sträussler-Scheinker or Fatal Familial Insomnia, and variant CJD caused by ingestion of food contaminated with bovine prion disease (bovine spongiform encephalopathy: BSE). Among these diseases, sCJD is most prevalent, accounting for more than 80% of patients and affects 1 to 1.5 people per million.

Prion diseases are fundamentally caused by a conformational change of the responsible protein, the prion protein, from its cellular isoform (PrP^C) to its disease-associated isoform (PrP^{Sc}). PrP is a secretory protein with an endoplasmic reticulum (ER) targeting signal at the amino-terminal end and a GPI-anchor signal end to a lipid rafts on the cell membrane at carboxy-terminal end. In addition, PrP localized on plasma membrane is taken up by endocytosis and undergoes degradation by degrading enzymes in lysosomes. To elucidate the neurodegenerative mechanisms of prion diseases, the physiological functions of PrP were analyzed and found to be involved in intracellular signaling, regulation of oxidative stress, and circadian rhythm. However, the mechanism of neurodegeneration in prion diseases remains unclear, including whether the loss of normal physiological functions due to structural changes or acquisition of novel functions for PrP. In addition, as a therapeutic agent for prion diseases, attempts have also been made to identify compounds that inhibit the structural conversion PrP^C to PrP^{Sc} and induce degradation of PrP^{Sc}. However, many of these drugs have resulted in drug resistant

of prion strains. Because these problems remain, the development of clinically satisfactory therapeutics continues. In Chapter 1, to elucidate the neurodegenerative mechanism of prion disease, considering the ectopic localization of pathogenic proteins to mitochondria has been reported to be involved in the pathogenesis of neurodegenerative disease, the mechanism of ectopic localization of PrP to mitochondria was conducted. In Chapter 2, conducted a basic study of hexafluoro-2-propanol (HFIP), which has been reported to possess strong α -helix-inducing activity for the development of new therapeutic agents of prion disease.

Chapter 1: Analysis of the mechanism of prion protein targeting to mitochondria and neurodegeneration in prion diseases

In many neurodegenerative diseases, mitochondria are actively involved in the onset and/or progression of diseases because the energy depletion of the neuronal cells directly leads to the dysfunction and degeneration of cells. Recently, it has been reported that ectopic localization of pathogenic proteins of neurodegenerative diseases to mitochondria can be a factor in disease and genetic mutations in the PrP gene has also reported to localize PrP to mitochondria and cause neurodegeneration. In addition, it has been also reported that PrP is localized to mitochondria in healthy mouse. Despite these findings, the precise mechanism of how PrP, a secretory protein, is targeted to mitochondria is not well understood. In Chapter 1, we used cultured cells to analyze the mechanism of PrP targeting mitochondria and its physiological importance in detail, including mitochondrial localization sequences on the amino acid sequence of PrP and receptors on the mitochondrial outer membrane. To clarify the amino acid

sequence responsible for the mitochondrial targeting of PrP, we have constructed various truncated forms of mouse PrP fusing GFP and observed intercellular localization of PrP. Consequently, the 18 amino acids at positions 122-139 around the molecule's middle were discovered to be critical for targeting PrP to mitochondria. Even when PrP was localized, the subcellular distribution of mitochondria in HeLa cells was normal. In N2a cells, however, mitochondria formed perinuclear aggregates and there was no distribution near the cell terminus. PrP was found in the intermembranous lumen or near the inner membrane of mitochondria in HeLa cells, but not in N2a cells, where it was found in the outer membrane as well as the intermembranous lumen and near the inner membrane. The mitochondrial outer membrane protein Tom70 and cytoplasmic the gamma and eta isoform of 14-3-3 proteins were required for PrP mitochondrial targeting. In addition, the zeta isoform of 14-3-3 protein was essential for the formation of mitochondrial perinuclear aggregates. These results suggested that PrP targets mitochondria via mitochondrial targeting sequence, gamma and eta isoforms of 14-3-3 proteins and Tom70. Neuron-specific localization of PrP at the mitochondrial outer membrane disrupts normal intracellular distribution of mitochondria in a zeta isoform of 14-3-3 protein-dependent manner. Since axons require large amounts of ATP for signaling, etc., it was suggested that a neuron-specific failure of mitochondrial supply at axon terminals may cause axonal degeneration and contribute to the neurodegeneration of prion diseases.

Chapter 2: Fundamental study of the inhalant anesthetic precursor hexafluoro-2-propanol for use as a therapeutic agent for prion disease

Prion diseases are thought to be triggered by the structural conversion of PrP^c

into PrP^{Sc}, which accumulates in the central nervous systems for some reason. Since the accumulation of PrP^{Sc} is the cause of prion disease, various drugs aimed at inhibiting the production of PrP^{Sc} have been investigated for the treatment of prion disease. However, the emergence of drug-resistant prion strains resulting from continuous drug administration has weakened therapeutic efficacy, and there are no clinically effective treatments available.

Sevoflurane is a commonly used inhalation anesthetic with relatively fewer side effects than other inhalation anesthetics because it is not metabolized to acyl halides. The fluorinated alcohol hexafluoro-2-propanol (HFIP) is a precursor of sevoflurane. Fluorinated alcohols, such as HFIP, have a particularly strong protein-denaturing activity and break the β -sheet structure leading to α -helix. Therefore, it has been used as a solvent to dissolve peptide aggregates such as amyloid β ($A\beta$) peptides. Although attempts have been made to identify compounds that inhibit the structural conversion of PrP^C to PrP^{Sc} as therapeutic agents for prion diseases, the problem with these agents, as mentioned above, is that continuous administration of these agents leads to the development of drug-resistant prion strains. On the other hand, HFIP has strong α -helix-inducing activity, should be able to unwind PrP^{Sc} into PrP^C, and PrP^{Sc} structure itself will be normalized. In chapter 2, we explored the possibility of HFIP as a therapeutic drug for prion diseases using recombinant PrP and scrapie-infected mouse neuroblastoma cells, an established *in vitro* model of prion disease.

Transmission electron microscopy of the morphology of PrP fibrils prepared from recombinant protein with HFIP revealed that the addition of 10 mM HFIP induced a branched, trifurcated fiber structure. Moreover, the addition of 20 mM HFIP

completely transformed the fibrous PrP into an amorphous shape. Compared to PrP the A β (1-40) did not alter the fibrous structure in the presence of HFIP, but a rather enhanced association of the amyloid fibrils. The measurement of circular dichroism spectrum revealed that HFIP has stronger α -helix inducing activity against PrP than A β (1-40). When HFIP was added to ScN2a cells and protease resistance was detected, the addition of HFIP above 15 mM significantly attenuated the protease resistance of PrP. Furthermore, ScN2a cells showed significantly lower cell viability with the addition of HFIP compared to N2a cells. These results confirm the strong α -helix induction activity of HFIP against PrP and its strong cytotoxicity against cells with PrP^{Sc}. Although there are some issues for practical application as a therapeutic agent, such as a narrow safety margin and the substrate specificity of PrP, the mechanism of action of HFIP for induction of PrP^{Sc} to PrP^C as a therapeutic agent for prion diseases is a novel approach that has not been developed so far, suggesting that fluorine compounds including HFIP may be a potential therapeutic agent for prion diseases.

<目次>

目次	2
諸言	3
第一章: プリオン病におけるプリオンタンパク質のミトコンドリアへの標的化と 神経変性機構の解析	
1. 序論	8
2. 材料及び方法	11
3. 結果	
3-1. PrP (122-139) は PrP のミトコンドリアへの局在に関与する	16
3-2. PrP が局在したミトコンドリアは神経細胞特異的に核周囲に 集積し、軸索の退縮を惹起する	16
3-3. ミトコンドリア外膜上の PrP はミトコンドリアを核周囲に 集積させる	17
3-4. 細胞質の 14-3-3 タンパク質は PrP のミトコンドリアへの 局在およびミトコンドリアの核周囲への集積に関与する	18
3-5. ミトコンドリア外膜上の Tom70 は PrP の受容体として 機能する	20
4. 考察	21
5. 小括	27
6. 図表	28
第二章: 吸入麻酔薬前駆体ヘキサフルオロ-2-プロパノールのプリオン病治療薬への 応用に向けた基礎的研究	
1. 序論	38
2. 材料及び方法	41
3. 結果	
3-1. PrP および A β 線維におよぼす HFIP の影響	47
3-2. HFIP は ScN2a 細胞における PrP のプロテアーゼ抵抗性を 減弱させる	47
3-3. HFIP は PrP の細胞内局在およびミトコンドリアの膜電位に 影響を与えない	48
3-4. ScN2a 細胞は HFIP に対する感受性が高い	49
4. 考察	50
5. 小括	55
6. 図表	56
総括	60
謝辞	63
引用文献	64

<諸言>

ヒトにおけるクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD: Creutzfeldt-Jacob Disease)、ゲルスマン・ストロイスラー・シャインカー病 (GSS: Gerstmann-Sträussler-Scheinker)、致死性家族性不眠症 (FFI: Fatal Familial Insomnia)、ヒツジやヤギにおけるスクレイピー、シカにおける慢性消耗病、ウシにおける牛海綿状脳症 (BSE: Bovine Spongiform Encephalopathy) を含み、伝達性海綿状脳症としても知られるプリオン病は、正常プリオンタンパク質 (PrP^C: cellular isoform of prion protein) が何らかの要因で伝達性を有する異常プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}: scrapie isoform of prion protein) に高次構造変化し、中枢神経系に蓄積することにより急速な神経変性を引き起こすまれな致死性疾患である [1]。致死性の神経変性疾患でありかつ人獣共通感染症であることから、医学領域および獣医学領域の双方で重要な疾患として知られている。

ヒトにおけるプリオン病は発症機序から、原因不明の孤発性/特発性、PrP をコードする遺伝子の変異に起因した遺伝性、外部からの PrP^{Sc} の伝播による獲得性 (感染性) プリオン病の3つに大別される。孤発性 CJD (sCJD: sporadic CJD) は年間 100 万人に約 1 人の率で発症し、CJD 症例の約 85% を占める [2]。平均生存期間は約 6 ヶ月であり、発症した患者の 85-90% が 1 年以内に死亡すると報告されている [3]。sCJD の発症要因は明らかとなっていないものの発生率が年齢とともに増加することから、PrP^{Sc} の産生確率とクリアランスの減少に起因している可能性があると考えられている [4]。さらに年齢に加えて、PrP をコードする遺伝子である PRNP のコドン 129 と 219 の遺伝子多型は sCJD の発症リスクに影響を及ぼすことが知られている [5]。コドン 129 では、メチオニン-メチオニン (MM 型)、メチオニン-バリリン (MV 型)、およびバリリン-バリリン (VV 型) の 3 つの多型をとるが、MV 型は最も平均生存期間が長く、VV 型と MM 型が続くことが報告されている [6]。また、神経機能の低下も生存率と同様

の傾向を示すことが報告されている [7]。以上のことから、コドン 129 の多型は sCJD の生存予測モデルにも使用されている [8]。対してコドン 219 では、グルタミン酸-グルタミン酸 (EE 型)、グルタミン酸-リジン (EK 型)、リジン-リジン (KK 型) の 3 つの多型をとるが、EK 型の sCJD 患者は著しく少ないことが報告されており [9]、コドン 129 と同様に遺伝子多型が保護的に働くと考えられている。約 10-15% を占める遺伝性プリオン病は、PrP のオープンリーディングフレームにおける遺伝的な変異により、PrP の高次構造変換のリスクが高まることが発症要因となると考えられている [3]。遺伝性プリオン病の病因となる変異は特定または複数のコドンにおける点突然変異、ナンセンス突然変異、PRNP の N 末端ドメインにおけるオクタペプチド反復配列の挿入または欠失とされている [10-13]。遺伝性プリオン病は臨床病型により遺伝性 CJD、GSS、FFI およびその他に分類され、現在までに 30 種類以上の遺伝子変異と 15 種類の欠失・挿入が報告されている [14]。獲得性 (感染性) プリオン病は、医学的または外科的処置による偶発的感染である医原性 CJD、BSE による人獣共通感染症として発生した変異型 CJD (vCJD: variant CJD) 、遺体を食する習慣を持ったパプアニューギニアの民族の風土病であるクールー病からなる [15]。医原性 CJD の要因は、PrP^{Sc} を含んだ患者からのヒト由来下垂体成長ホルモンの投与、硬膜外科移植があげられる [16, 17]。vCJD はプリオン病のなかでもまれな病型であり、1996 年に初めて英国で報告されて以降 [18]、2021 年 7 月までに世界で 232 例の報告がある。本邦においても 2006 年に初めて報告され [19]、哺乳動物由来タンパク質飼料の利用の規制やと畜場における全頭検査の契機となった [20]、獣医学領域における最も重要な疾患の一つである。

病因タンパク質であるプリオンタンパク質 (PrP: Prion protein) は動物種を超え高度にアミノ酸配列が保存された糖タンパク質であり [21]、中枢神経系や末梢神経系で高発現することが知られている [22]。マウスの PrP は 254 個のアミノ酸からなる前

駆タンパク質として翻訳され、疎水性に富む N 末端の 22 個のアミノ酸はシグナルペプチド、C 末端のアミノ酸はグルコシルホスファチジルイノシトール (GPI: glycosylphosphatidylinositol) アンカー付加シグナルとして機能し、小胞体において除去される [23, 24]。また、179 番目と 214 番目のシスチンによってジスルフィド結合が形成され [25]、181 番目と 197 番目のアスパラギンに糖鎖が付加される [26]。細胞膜へ輸送された PrP は細胞膜上のマイクロドメインである脂質ラフトに局在し、GPI アンカーによって脂質二重膜の外側に繋ぎ止められる [27]。さらに細胞膜上に局在した PrP はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、リソソーム中の分解酵素による分解を受ける [28]。プリオン病の神経変性機構の解明を目的として、PrP の正常な機能の解析が進み、細胞内シグナル伝達 [29] や酸化ストレスの制御 [30]、概日リズムの調節 [31] 等に関与していることが明らかとなった。しかしながら高次構造変換を通じた PrP の正常な生理学的な機能の喪失、または新たな機能獲得のいずれが神経変性の要因となり得るのかということを含め、プリオン病の神経変性機構が詳細に明らかとなっていないのが現状である。また、前述のとおりプリオン病が PrP の高次構造変換によって惹起されることから、PrP^{Sc} の産生の阻害と分解の亢進を標的とした化合物が同定されてきた。例としてペントサンポリ硫酸 [32] やコンゴレッド [33]、アルプレノロール [34] のプリオン持続感染細胞株への添加は、PrP^{Sc} のレベルを低下させることが報告されている。しかしながら病気の進行につれてこれらの薬剤に耐性を持ったプリオン株が出現することが薬剤の効果の減弱をもたらした [35]、今日において臨床的に十分な効果が得られた治療薬が存在しない。

そこで本研究では、プリオン病の神経変性機構の解明ならびに新規治療薬の開発に向けた基礎的研究を行った。第一章では、プリオン病の神経変性機構の解明を目的とし、神経変性疾患の病因タンパク質のミトコンドリアへの異所性の局在が神経変性の要因となり得ることが報告されていることを踏まえ、PrP のミトコンドリアへの標的化機構

の解析を行った。タンパク質のミトコンドリアへの局在には固有のミトコンドリア局在配列、細胞質やミトコンドリア側の標的化分子を要することから、当該因子の同定を通じて PrP のミトコンドリアへの標的化機構を解析し、さらに構築した実験系を用いて PrP のミトコンドリアへの異所性の局在が細胞機能に及ぼす影響を観察した。PrP のミトコンドリア局在配列を同定するため、GFP で標識した様々な長さの PrP のトランケート発現ベクターを構築し、PrP とミトコンドリアの細胞内局在を観察した結果、PrP のアミノ酸配列上の 122 番目から 139 番目までの 18 アミノ酸がミトコンドリア局在配列として機能することを明らかとした。さらに PrP のミトコンドリアへの局在は、非神経細胞におけるミトコンドリアの細胞内分布に影響を及ぼさなかった一方で、神経細胞における正常なミトコンドリアの細胞内分布を破壊させ、高度にミトコンドリアを核の周囲に集積させた。また、この現象は神経細胞特異的にミトコンドリア外膜に局在した PrP に起因していた。加えて RNA 干渉を用いた阻害実験により、PrP のミトコンドリアへの局在に細胞質の因子として 14-3-3 γ ならびに η 、ミトコンドリア外膜上の受容体として Tom70 が機能していることを明らかとした。また、ミトコンドリア外膜上に局在した PrP は、細胞質の 14-3-3 ζ 依存的にミトコンドリアを核周囲に集積させることを明らかとした。軸索はシグナル伝達等で多量の ATP を要求することから、神経細胞における軸索へのミトコンドリア供給不全は軸索の脱落を惹起し、このことがプリオン病の神経変性の一端を担っていることが示唆された。第二章では、プリオン病の発症が α -ヘリックス構造に富んだ PrP^C の β -シート構造に富んだ PrP^{Sc} への高次構造変換によって惹起されること、第一章で見出されたミトコンドリア局在配列中にも PrP のアミロイド線維形成に重要な役割を担うことが報告されているアミノ酸残基が含まれていることを踏まえ、強い α -ヘリックス構造誘導活性を持つことが知られているヘキサフルオロ-2-プロパノール (HFIP: Hexafluoro-2-propanol) に着目し、HFIP のプリオン病治療薬への応用へ向けた基礎的検討を行った。組換えタンパク質より作成した

PrP 線維と HFIP を混和し、37°C で 24 時間インキュベートしたところ、10 mM の HFIP は PrP の線維構造を三叉の構造へと変化させた。さらに 20 mM の HFIP は PrP の線維構造を完全に消失させ、特異的な構造を持たないアモルファス様の凝集体を形成させた。一方でアミロイド β ($A\beta$: Amyloid beta) (1-40) 線維への HFIP の添加は濃度依存的に線維どうしの会合を促進させた。また、円偏光二色性スペクトルの測定により、HFIP は $A\beta$ (1-40) 線維と比較して、PrP 線維に強い α -ヘリックス誘導活性を持つことが明らかとなった。さらプリオン持続感染細胞への HFIP の添加は PrP^{Sc} の特徴であるプロテアーゼに対する抵抗性を減弱させた。ScN2a 細胞においても HFIP の PrP に対する α -ヘリックス誘導活性を確認できた一方で、HFIP は PrP の細胞内局在やミトコンドリアの膜電位に影響を及ぼさなかった。また HFIP は N2a 細胞と比較し、ScN2a 細胞に対して強い細胞毒性を示した。治療域の狭さや基質特異性の問題が課題として挙げられるものの、HFIP をはじめとしたフッ素化合物のプリオン病治療薬となり得る可能性が示唆された。

本博士論文の第一章の一部 [36]、第二章 [37] の結果についてはそれぞれすでに誌上発表されている。

<第一章>

プリオン病におけるプリオンタンパク質のミトコンドリアへの標的化と 神経変性機構の解析

1. 序論

前述のとおりプリオン病の病因タンパク質はプリオンタンパク質 (Prion Protein : PrP) であり、正常型のプリオンタンパク質 (PrP^C) の異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) への高次構造変換によって発症が惹起されると考えられているが、プリオン病の神経変性機構は未だ明らかとなっていない。一方、細胞が機能を維持するためには、1万種を超えるタンパク質が細胞内で合成され、必要とされる特定の細胞内区画へ運ばれる必要がある。一部のミトコンドリアのタンパク質を除くすべてのタンパク質の翻訳は細胞質で始まる。オルガネラに局在するタンパク質は細胞質での翻訳中または翻訳後に固有の局在配列をもとに目的のオルガネラに標的化するのに対し [38-40]、細胞内膜系のタンパク質は N 末端側の小胞体移行配列の翻訳と同時に粗面小胞体へ標的化し、小胞体膜上の翻訳後に内腔に取り込まれ、ゴルジ体を通じて最終的に細胞外へ分泌されるか、細胞膜やリソソーム、他細胞内膜系の構成成分として機能する [41]。タンパク質の細胞内における異所性の局在は細胞機能に影響を及ぼし、様々な疾患の発症に関与することが知られている [42]。特に神経変性疾患の発症にはミトコンドリアへの病因タンパク質の異所性の局在が関与することが報告されており、アルツハイマー型認知症におけるアミロイド前駆タンパク質やアミロイドβ [43]、筋萎縮性側索硬化症における TAR DNA 結合タンパク質 43 [44]、パーキンソン病における α-シヌクレイン [45] 等の複数の神経変性疾患で、病因タンパク質のミトコンドリアへの異所性の局在が疾患の原因となり得ることが報告されている。

PrP は N 末端側に小胞体移行配列および C 末端側に GPI アンカー付加配列を有する分泌型の糖タンパク質であり、細胞膜上の脂質ラフトと呼ばれるドメインに局在する

[46, 47]。さらに細胞膜に局在した PrP はエンドソームによって細胞内に取り込まれ、リソソームにより加水分解される [28]。一方、PrP が典型的な分泌型のタンパク質としての特徴を持つにも関わらず、PrP がミトコンドリアの機能不全に関与するとの報告が多数なされている。例として、野生型の PrP を強制発現させた老齢のトランスジェニックマウスでは、PrP^{Sc} の接種がなくとも中枢神経系の局所的な空胞化を含むミトコンドリア脳筋症を自然発症することが報告されている [48]。また、PrP を過剰発現させた老齢の Tg (MoPrP) 4053/FVB マウスではプロテアソーム活性の低下に一致した PrP のミトコンドリアへの異所性の局在と細胞質におけるグルタチオン濃度の低下、マンガンスーパーオキシドジスムターゼ活性の低下、シトクロム c の細胞質への放出、カスパーゼ 3 の活性化、DNA の断片化が引き起こされることが報告されている [49]。さらに、遺伝性プリオン病の一つであるゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病 (GSS: Gerstmann-Sträussler-Scheinker) の要因となる PrP の 145 番目のストップコドンへのアンバー変異 (Y145STOP) は、マウス神経芽細胞腫由来 Neuro2a (N2a) 細胞および PrP 遺伝子欠損マウスから樹立された海馬神経細胞由来株 Hpl3-4 細胞において PrP をミトコンドリアに局在させ、細胞死を引き起こすこと報告されている [50]。また近年 Faris らは、健康な野生型の若齢マウスでも PrP の一部がミトコンドリアに局在することを報告した [51]。しかしながらこれらの先行研究に対し、分泌系のタンパク質である PrP がいかにしてミトコンドリアに局在し、神経変性を起こしうるのかについては、詳細が明らかでない。さらに、前述のとおりタンパク質のミトコンドリアへの局在には固有のミトコンドリア局在配列が必須であるものの、PrP のアミノ酸配列中のミトコンドリア局在配列や PrP のミトコンドリアへの標的化に関与する因子も同定されていない。そこで本研究では、PrP のアミノ酸配列中のミトコンドリア局在配列およびミトコンドリアへの標的化に関与する因子の同定を通じて、PrP のミトコンドリアへの標的化機構を明らかとすることを目的とし

た。さらに培養細胞を用いた PrP のミトコンドリアへの標的化系の構築を通じて、PrP のミトコンドリアへの局在が細胞機能へ及ぼす影響を観察した。

2. 材料及び方法

2-1. GFP 融合トランケート PrP の構築

GFP 融合トランケート PrP は既報に従い [52]、pcDNA3.1-MHM2 PrP:GFP をテンプレートとして

Forward primer 5'-CGGGATCCACCATGGCGAACCTTGGCTACTGGCTG-3',

Reverse primer

5'-CCGCTCGAGTCACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGA-3' (1-33),

5'-CCGCTCGAGTCACTGAGGTGGGTAACGGTT-3' (1-52),

5'-CCGCTCGAGTCATCCTTGGCCCCATCCACC-3' (1-91),

5'-CCGCTCGAGTCACACTACTGCCCCAGCTGC-3' (1-121),

5'-CCGCTCGAGTCAATG GATCATGGGCCTGCT-3' (1-139)

を用いて PCR で増幅した。PCR 産物は制限酵素 BamHI および XhoI を用いて消化し、pcDNA3.1-MHM2PrP:GFP の BamHI-XhoI 断片に挿入した。得られたプラスミドの挿入は、ダイレクトシーケンス法で確認した。

2-2. 細胞培養

ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞、アフリカミドリザル腎臓由来 COS-7 細胞およびマウス神経芽細胞腫由来 N2a 細胞は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) より購入した。ScN2a (Chandler) 細胞は北海道大学 大学院獣医学研究院 獣医衛生学教室の堀内基広教授の分与を受けた。N2a 細胞および ScN2a 細胞は終濃度 10% のウシ胎児血清および 100 units/mL のペニシリン、100 µg/mL のストレプトマイシンを含む Eagle's Minimum Essential Medium (Cat. No. 051-07615、富士フィルム和光純薬株式会社、大阪)、HeLa 細胞および COS-7 細胞は終濃度 10% のウシ胎児血清および 100 units/mL のペニシリン、100 µg/mL のストレプトマイシンを含む

Dulbecco's modified Eagle's medium (Cat. No. 043-30085、富士フイルム和光純薬株式会社) を用いて 5%CO₂、37°C、加湿条件で培養した。トランケート発現ベクターのトランスフェクションは Lipofectamine™ 3000 (Cat. No. 11668027, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用い、添付取り扱い説明書に従って行った。N2a 細胞の神経細胞への分化は既報に従い、細胞播種から 24 時間後に血清不含培地に交換して 48 時間培養することで誘導し [53]、神経突起の伸長により神経細胞への分化を確認した。

2-3. 生細胞イメージングと統計学的解析

生細胞観察のため、 2×10^4 個の細胞を 35 mm 径のガラスボトムディッシュ (Cat. No. D11130H、松浪硝子工業、大阪) に播種した。生細胞観察は、IX-73 蛍光顕微鏡 (オリンパス株式会社、東京) を用いて行った。ミトコンドリアは終濃度 50 ng/mL の MitoTracker™ Red CMXRos (Cat. No. M7521, Thermo Fisher Scientific) を培地に添加し、37°C で 15 分間インキュベートすることで染色した。PrP のミトコンドリアの局在は、サンプルあたり少なくとも 100 個の細胞をカウントした。すべての値は独立した 3 回の試行の平均値 \pm 標準偏差で示した。群間の統計学的有意差は Student の t 検定 (両側) で評価し、危険率が 5%未満の際に有意差ありとした。

2-4. ウェスタンブロット法

N2a 細胞および HeLa 細胞はスクレーパーを用いて培養皿より剥離し、4°C、2,000×G、5 分間遠心することでチューブ内に回収した。細胞ペレットにプロテアーゼ阻害剤 (Cat. No. 25955、ナカライテスク株式会社、京都) を含んだ PBS (-) を添加・懸濁し、ガラスダウンス型ホモジナイザー (Cat. No. 357538, WHEATON Industries Inc., Millville, NJ, USA) を用いて氷上で穏やかに 25 回ストロークすることで、細胞を破碎

した。サンプル中に含まれるタンパク濃度は Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Cat. No. 500-006, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて添付取扱説明書に従い測定した。ポリアクリルアミド電気泳動は XV PANTERA Gel (Cat. No. NXV-241P20、ディー・アール・シー株式会社、東京) を用いて 300 V で 15 分間行うことでタンパク質を分離させた。電気泳動の後、ゲル中のタンパク質を iBlot™ 2 Gel Transfer Device (Thermo Fisher Scientific) を用いて添付取扱説明書に従い PVDF 膜に転写させた。5%スキムミルクを含む Phosphate buffered saline with Tween-20 (PBS-T) を添加し、室温で 30 分間インキュベートすることでブロッキングを行った後、PBS-T で一次抗体を希釈し、室温で一晩インキュベートした。15 分 1 回、5 分 3 回 PBS-T を用いてメンブレンを洗浄した後、5%スキムミルクを含む PBS-T で 5,000 倍に希釈した Horseradish peroxidase (HRP) 標識-抗マウス IgG 抗体を添加し、室温で 1 時間インキュベートした。PBS-T を用いて 15 分 1 回、5 分 3 回メンブレンを洗浄した後、HRP 化学発光検出試薬 (Cat. No. WBLUR0500, Merck Millipore, Billerica, MA, USA) をメンブレンに添加し、室温で 1 分間インキュベートした。画像は ChemiDoc™ Touch (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて取得し、分子量マーカーとして Dr. Western (Cat. No. 46901900, オリエンタル酵母工業株式会社、東京) を用いた。一次抗体として用いた抗体の型番および希釈倍率を表 1 に示す。

2-5. 透過型電子顕微鏡観察

細胞を pH7.4 の PBS で希釈した 2%グルタルアルデヒド緩衝液ならびに 1%の四酸化オスミウム溶液で固定した。エタノールを用いて脱水ならびに t-ブタノールへ置換した後、エポキシ樹脂中に包埋した。超薄切片は酢酸ウラニルと硝酸鉛を用いて染色し、H-7000 透過型電子顕微鏡 (株式会社日立ハイテク、東京) を用いて画像を取得した。

2-6. ミトコンドリアの単離とサブコンパートメントの分画

10 cm ディッシュ 2 枚の N2a および HeLa 細胞を湿重量 8 倍量のミトコンドリア単離バッファー (70 mM Mannitol, 250 mM Sucrose, 10 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 0.2 mM EGTA) で懸濁し、ホモジナイザーペッスルを用いて氷上で穏やかに 25 回攪拌することで細胞を破碎した。細胞懸濁液を 4°C で 2,000×G、3 分間遠心し、上清をさらに 4°C、6,000×G、10 分間遠心することでミトコンドリア画分のペレットを得た。ペレットを 20 μ L のミトコンドリア単離バッファーでサスペンドした後ミトコンドリア外膜画分を得るため、単離したミトコンドリアに対し、終濃度 0.15 mg/mL となるようにジギトニン (Cat. No. 12333-51、ナカライテスク) を添加し、4°C で穏やかに攪拌しながら 15 分間インキュベートした。次いで 4°C、13,000×G で 15 分間遠心し、可溶性画分である上清をミトコンドリア外膜画分、ペレットを内膜が露出したマイトプラスト画分として単離した。マイトプラスト画分に対し、終濃度 250 μ g/mL となるように Proteinase K (PK) (Cat. No. 169-212041、富士フイルム和光純薬工業株式会社)、ならびに TritonX-100 (Cat. No. X100-100ML, Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) を添加し、氷上で 60 分間インキュベートし、PK に対するタンパク質の感受性からタンパク質のミトコンドリア内における局在を推定した。

2-7. RNA 干渉

RNA 干渉は Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent (Cat. No. 13778150, Thermo Fisher Scientific) を用い、リバーストランスフェクション法によって行った。60 mm ディッシュを用い、6 μ L の Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent を 300 μ L の Opti-mem® (Cat. No. 31985-070, Thermo Fisher Scientific) に希釈し、Opti-mem® に溶解した 5 μ M の siRNA 12 μ L と混合することで siRNA Complex を作成した。作成した 600 μ L の siRNA Complex をディッシュに添加し、室温で 15

分間静置した。その後、5.4 mL の培地に懸濁した 3×10^5 の細胞を播種し、24 時間後に新しい培地に交換した。細胞播種より 24 時間後にプラスミド DNA を遺伝子導入し、さらに 24 時間後に蛍光顕微鏡による観察およびタンパク質発現解析サンプルとした。RNA 干渉に用いた siRNA の配列は表 2 のとおりである。なお、ネガティブコントロールとして、MISSION® siRNA Universal Negative Control #1 (Cat. No. SIC001-10NMOL, Sigma-Aldrich) を用いた。

3. 結果

3-1. PrP (122-139) は PrP のミトコンドリアへの局在に関与する

PrP のミトコンドリアへの局在に関与するアミノ酸配列を同定するため、様々な長さ
にトランケートし、GFP を融合させた PrP の発現ベクターを構築した (図 1 A)。これ
らのトランケート PrP 発現ベクターを HeLa 細胞および N2a 細胞に一過性に遺伝子導
入し、抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロットによりタンパク質の発現を確認した (図
1 B)。

次に、これらのトランケート PrP の HeLa 細胞における細胞内局在を蛍光顕微鏡を用
いて観察した。PrP (1-33)、PrP (1-52)、PrP (1-191) および PrP (1-121) は、小胞体膜
への局在配列である PrP (1-22) を有しながらも細胞質に局在した。全長の PrP である
PrP (1-254) はすでに報告されている PrP の典型的な細胞内局在パターンである細胞
膜とゴルジ体への局在を示した [52, 54]。一方で PrP (1-139) は発現したすべての PrP
がミトコンドリアに局在した (図 2 A, B)。同様に、アフリカミドリザル腎臓由来 COS-
7 細胞にトランケート PrP を遺伝子導入し細胞内局在を観察したところ、全長の PrP
(1-254) は細胞膜とゴルジ体に局在した。一方で PrP (1-139) は HeLa 細胞と同様に発
現したすべての PrP がミトコンドリアに局在した (図 2 C)。PrP (1-121) は細胞質、
PrP (1-139) はミトコンドリアにそれぞれ局在したことから、PrP (122-139) はミトコ
ンドリアへの局在に関与するアミノ酸配列であることが示唆された。

3-2. PrP が局在したミトコンドリアは神経細胞特異的に核周囲に集積し、軸索の退縮を惹起する

次に、トランケート PrP を N2a 細胞に導入し、PrP の細胞内局在を蛍光顕微鏡を用い
て観察した。HeLa 細胞と同様に PrP (1-33)、PrP (1-52)、PrP (1-191) および PrP (1-
121) は細胞質、PrP (1-139) はミトコンドリアにそれぞれ局在した。さらに HeLa 細

胞や COS-7 細胞と異なり、PrP (1-139) が局在したミトコンドリアは正常な細胞内分布を失い、細胞膜方向へ向かう順方向の移動が阻害された核周囲の高度な集積体として観察された (図 3 A, B)。また、スクレイピーのプリオン株である Chandler 株を持続的に感染させた、PrP^{Sc} 持続産生株である ScN2a 細胞においても PrP (1-139) はミトコンドリアに局在し、ミトコンドリアは N2a 細胞と同様に核の周囲に高度に集積した (図 3 C)。さらに透過型電子顕微鏡による観察によっても、PrP (1-139) を発現する細胞は、コントロールの細胞と比較してミトコンドリアが核の周囲に集積している様子が観察された。また核周囲に集積した N2a 細胞のミトコンドリアは、酸化的リン酸化において ATP 合成を担う呼吸鎖複合体が局在するミトコンドリア内膜の折りたたみ構造であるクリステ構造 [55] が高度に破壊されていた (図 3 D)。

さらに PrP が引き起こすミトコンドリアの核周囲の集積が神経に及ぼす生理学的意義を明らかとするため、神経細胞への分化を誘導した N2a 細胞におけるトランケート PrP の細胞内局在と細胞形態を観察した。遺伝子導入をしていない細胞では、伸長した軸索を確認でき、軸索に沿って末端までミトコンドリアが局在していた (図 4 A)。神経細胞において PrP (1-254) は細胞膜および軸索に局在し、ミトコンドリアはコントロールの細胞と同様に軸索に沿って末端まで局在していた。一方で PrP (1-139) は未分化細胞と同様にミトコンドリアに局在し、ミトコンドリアが高度に核の周囲に集積した。さらに PrP がミトコンドリアに局在した神経細胞を明視野で観察したところ、伸長した軸索の退縮が観察された (図 4 B)。以上の結果より、PrP のミトコンドリアへの局在は軸索へのミトコンドリアの供給不全を引き起こし、軸索の退縮を惹起することが示唆された。

3-3. ミトコンドリア外膜上の PrP はミトコンドリアを核周囲に集積させる

ミトコンドリアは二重膜に囲まれたオルガネラであり、外膜、膜間腔、内膜、マトリックスの 4 つのサブコンパートメントより構成される。PrP がミトコンドリア外膜もし

くはミトコンドリア内部のいずれに局在しているのかを明らかとするため、ミトコンドリアの各膜画分を生化学的に単離した。まず外膜画分と内膜由来の小胞であるマイトプラスト画分を得るため、PrP (1-139)-GFP を遺伝子導入した HeLa 細胞および N2a 細胞のミトコンドリアを緩徐な界面活性剤であるジギトニンを用いて可溶化し、遠心分離に供した。可溶性画分である上清を外膜画分 (図 5 A①) として回収し、ペレットをマイトプラスト画分として単離した。さらに得られたマイトプラスト画分に対して PK を処理し、ウェスタンブロットで検出した PK に対するタンパク質の感受性をもとに PrP の局在を推定した。膜間腔および内膜近傍に局在する場合、PK の処理によってバンドが消失する (図 5 A②)。内膜を貫通するようにタンパク質が局在する場合、内膜内側には PK が到達しないため、内側部分が PK 抵抗性の分子量の小さなバンドとして検出される (図 5 A③)。マトリックスに局在する場合にはタンパク質全長が PK 抵抗性となるため、PK の処理でバンドの消失がみられない (図 5 A④)。PK と同時に TritonX-100 を処理した場合、ミトコンドリア内膜が可溶化されるため、いずれの局在でもバンドが消失し、非特異的バンドのみが検出される。それぞれの膜画分に含まれる PrP (1-139) を、抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロットにより検出したところ、HeLa 細胞では、PrP (1-139) はマイトプラスト画分にのみバンドが検出され、PK および PK ならびに TritonX-100 の処理によってバンドが消失した。一方で N2a 細胞では、PrP (1-139) は外膜画分とマイトプラスト画分の双方に検出された (図 5 B, C)。以上の結果から、N2a 細胞において PrP (1-139) の一部はミトコンドリア内部に取り込まれず、ミトコンドリア外膜上にとどまることが示唆された。

3-4. 細胞質の 14-3-3 タンパク質は PrP のミトコンドリアへの局在およびミトコンドリアの核周囲への集積に関与する

In vitro の研究により、様々なミトコンドリア前駆タンパク質のミトコンドリアへの

輸入には細胞質のタンパク質が関与していることが古くより報告されている [56]。そこで PrP のミトコンドリアへの標的化を担う細胞質側の因子として 14-3-3 タンパク質に着目した。当該因子は Hisch らが孤発性 CJD 患者と正常人の脳組織を二次元電気泳動で比較・検討した結果、CJD 患者での特異性を示すことが報告されている [57]。また、1998 年 WHO の診断基準では髄液検査における 14-3-3 タンパク質が補助的診断基準項目の一つとして採用されている。さらにタンパク質の機能として、*in vitro* の実験系においてミトコンドリア前駆タンパク質のミトコンドリアへの輸入促進効果を持つことが報告されている [58-60]。14-3-3 タンパク質が PrP のミトコンドリアへの標的化に関与しているか否かを明らかとするため、RNA 干渉を用いた発現阻害実験を実施した。真核細胞において 7 つのアイソフォームより構成される 14-3-3 タンパク質のそれぞれのアイソフォームに特異的な siRNA を構築し、14-3-3 タンパク質の発現を阻害した上で PrP (1-139) を導入し、蛍光顕微鏡を用いた観察を行った。特異的なタンパク質発現の阻害は、各アイソフォームに特異的な抗体を用いたウェスタンブロットによって確認した (図 6 A)。14-3-3 β , ϵ , σ , τ の発現を阻害したとき、PrP (1-139) は、スクランブルコントロールと同様にミトコンドリアに局在し、ミトコンドリアの細胞内分布もスクランブルコントロールと同様に核周囲の集積体として観察された。一方で 14-3-3 γ および η の発現を阻害したとき、PrP (1-139) は細胞質に局在し、ミトコンドリアの細胞内分布も正常な細胞内分布を示した。さらに 14-3-3 ζ の発現を阻害したとき、PrP (1-139) はミトコンドリアに局在したものの、ミトコンドリアは細胞全体に局在し、正常な細胞内分布を示した (図 6 B)。以上の結果から、14-3-3 γ および η は PrP (1-139) のミトコンドリアへの局在に必須であり、さらに PrP (1-139) がミトコンドリアに局在した後、14-3-3 ζ がミトコンドリアの核周囲への集積体の形成に関与していることが示唆された。

3-5. ミトコンドリア外膜上の Tom70 は PrP の受容体として機能する

TOM 複合体は細胞質で合成されたミトコンドリアの前駆体タンパク質のミトコンドリア内部への中心的な搬入孔として機能する [61]。Tom 複合体は 7 種類のサブユニットより構成され、Tom40 はタンパク質の外膜透過のチャネルを形成している。また、Tom20、Tom22、および Tom70 は外膜の細胞質側にドメインを露出させ、前駆タンパク質を認識して Tom40 に導く [62]。Tom5、Tom6、Tom7 は、small Tom タンパク質と呼ばれ TOM 複合体の調節因子として機能し、Tom5 はタンパク質の輸送 [63]、Tom6 および Tom7 は TOM 複合体の安定性にそれぞれ寄与すると考えられている [64]。そこで PrP のミトコンドリア側の認識および外膜の透過に TOM 複合体が関与しているかを明らかにするため、N2a 細胞に Tom20、Tom22、Tom40、Tom70 のそれぞれに特異的な siRNA を導入した上で、PrP (1-139) を導入し、細胞内局在を観察した。siRNA によるサブユニット特異的なタンパク質発現の阻害はウェスタンブロットにより確認した (図 7 A)。この条件で PrP (1-139) を導入し、蛍光顕微鏡を用いた観察を行ったところ、Tom20、Tom22、Tom40 の発現を阻害したとき PrP (1-139) は、スクランブルコントロールと同様にミトコンドリアに局在し、ミトコンドリアもスクランブルコントロールと同様に核周囲の集積体として観察された。一方で Tom70 の発現を阻害したとき、PrP (1-139) は細胞質に局在し、ミトコンドリアの細胞内分布も正常な細胞内分布を示した (図 7 B)。以上の結果から、PrP (1-139) のミトコンドリア外膜上の認識機構に、Tom70 が受容体として関与していることが示唆された。

4. 考察

分泌系タンパク質 [65] とミトコンドリア前駆体タンパク質 [66] の細胞内輸送システムは大きく異なる。PrP は分泌系タンパク質に特徴的な配列を有しているのにも関わらず [46, 47]、多くの先行研究において、PrP がミトコンドリアに局在するとの報告がなされている [48-51, 67]。そこで PrP のミトコンドリアへの局在に関する配列を同定するため、本研究では様々な長さの PrP のトランケート発現ベクターを構築し、PrP の細胞内局在を観察したところ、122 番目から 139 番目までの 18 アミノ酸である “GGLGGYMLGSAMSRPMIH” がミトコンドリアへの局在配列として機能することを見出した (図 2 A-C, 図 3 A-C)。これらの 18 アミノ酸は典型的なミトコンドリア局在配列と共通の特徴を持たないため [68, 69]、PrP のアミノ酸配列上の隠されたシグナル配列として機能していると考えられる。本研究で用いたコンストラクトは非常に短く、PrP (1-33)、(1-52)、(1-91)、(1-121) は細胞質への局在を示したことから、これらの新生ペプチド鎖の小胞体膜への共翻訳に失敗し、その後の正しい細胞内局在が妨げられた可能性がある。しかしながら、Pfeiffer らの先行研究によると [70]、PrP (1-155) の長さのコンストラクトでも正常な共翻訳が起こることから、少なくとも PrP (1-121)、(1-139) の長さでは PrP (1-22) は小胞体移行配列として機能している可能性がある。したがって本実験条件において PrP (1-22) の小胞体移行配列としての機能は PrP (122-139) のミトコンドリア局在配列よりも弱く、結果的に PrP (1-139) はミトコンドリアへの局在を示したと考えられる。さらに GPI アンカー型タンパク質の小胞体への取り込み経路はシグナル認識粒子 (SRP: signal recognition particle) の認識を受け、Sec61 トランスロコンを介して小胞体内腔に取り込まれる SRP 依存経路と、SRP 非依存的に小胞体膜へ取り込まれる SRP 非依存経路の二つに大別されることが知られている [71]。SRP 非依存経路はさらに Sec62 経路、guided entry of tail anchored protein (GET) 経路、SRP-independent 経路の 3 つに大別され、近年 PrP は Sec62 経路および GET

経路を介して小胞体内腔へ取り込まれること報告されている [72]。さらに、PrP をはじめとした N 末端における小胞体移行配列の疎水性が低い GPI アンカー型タンパク質は小胞体移行配列としての機能が低いために、細胞質において全長が前駆体タンパク質として合成され、より疎水性の高い GPI アンカー付加配列をもとに小胞体へ標的化して分泌タンパク質として機能することが報告されている [72]。このことから、細胞質での合成途中に小胞体移行配列よりも機能の高いミトコンドリア局在配列で新生鎖の翻訳が停止した結果、PrP がミトコンドリアへ局在したものと考えられる。本実験条件では N 末端を削除したトランケート PrP の局在は検討していないため、C 末端側にもミトコンドリアへの標的化に関与する配列が存在する可能性もある。そのような場合でも今回の結果から、PrP (122-139) は少なくとも部分的にはミトコンドリアへの標的化に必須であると考えられる。

神経細胞はアストロサイトやオリゴデンドロサイトなどの他の細胞と比較して、解糖能が限られている [73]。しかしながら、神経細胞はシナプス小胞の分泌、膜電位の維持、能動輸送、活動電位からの回復など様々な場面で他の細胞よりも多くの ATP を必要とすることが知られている [74, 75]。したがって、これらの活動に十分なエネルギーを供給するため、ミトコンドリアは軸索や樹状突起に沿って長い距離を微小管上で絶え間なく移動している [76]。このミトコンドリアの移動は、細胞膜に向かう順方向の移動はキネシン、核に向かう逆方向の移動はダイニンが担っている [77-79]。本研究では PrP に依存的なミトコンドリアの核周囲への集積が神経細胞特異的に観察されること、さらにミトコンドリアの核周囲への集積は軸索の退縮を引き起こすことが明らかとなった (図 4 A, B)。加えてこの現象は HeLa 細胞では、PrP がより速やかに外膜を透過しミトコンドリア内部に取り込まれるのに対し、N2a 細胞や ScN2a 細胞では、PrP の一部がミトコンドリア外膜上にとどまり (図 5)、ミトコンドリア外膜上の PrP がキネシンモーター複合体とミトコンドリアとの相互作用を阻害し、順方向の移動が阻害され

たことに起因した現象であることが示唆された。このことから、PrP のミトコンドリア外膜への蓄積の抑制は、PrP 依存性のミトコンドリア機能障害を抑制し、治療標的となり得る可能性がある。また、ミトコンドリアの細胞内輸送に関与する分子は酵母から哺乳類まで比較的保存されており、神経細胞において異なるミトコンドリア輸送機構が存在することは考えにくい [80-83]。

また透過型電子顕微鏡観察の結果から、PrP が局在したミトコンドリアは正常な細胞内分布を失っていることに加え、内膜におけるクリステ構造が高度に破壊されていることが明らかとなった (図 3 D)。クリステは内膜の表面積を増加させることにより、酸化的リン酸化の効率を上昇させていると考えられている [84]。さらに、電子伝達系の構成成分を集積させることで、ATP 産生効率を促進させている [85, 86]。近年 Wu らはプリオン感染マウスや神経毒性を持つ PrP (106-126) [87] の添加が、クリステ構造の破壊と細胞内 ATP の減少、ミトコンドリア膜電位の低下を引き起こすことを報告している [88]。以上を踏まえると PrP のミトコンドリアへの局在は、呼吸活性の低下とミトコンドリア機能不全を惹起することが示唆された。

さらに本研究では PrP のミトコンドリアへの標的化に細胞質からミトコンドリア外膜への輸送時に分子シャペロンなど他の分子が関わっている可能性を踏まえ、PrP のミトコンドリアへの標的化を担う細胞質側の因子として 14-3-3 タンパク質の関与を RNA 干渉を用いて検討した。その結果 14-3-3 γ および η の発現阻害は PrP のミトコンドリアへの局在を抑制した (図 6)。プリオン病の診断マーカーとして採用されている 14-3-3 タンパク質は古くよりミトコンドリア前駆タンパク質のミトコンドリアへの輸入促進効果を持ち [58-60]、ミトコンドリアへの標的化を担うシャペロンとしての活性を持つことも報告されている [89]。また 14-3-3 タンパク質は HSP60 およびリン酸化非依存的に PrP と複合体を形成してミトコンドリアに局在することや [90]、PrP (106-126) ペプチドとの相互作用が報告されている [91]。本研究でミトコンドリアへの局在を示

した PrP (1-139) は 14-3-3 タンパク質との相互作用が報告されている PrP (106-126) を含むことから、PrP (106-126) を介して PrP (1-139) と結合した 14-3-3 γ および η がシャペロンとして働き、PrP をミトコンドリアへ導くと考えられた。一方で本研究では PrP と 14-3-3 タンパク質の相互作用を確認していないため、PrP と 14-3-3 タンパク質が細胞内で直接相互作用していない可能性も考えられる。14-3-3 タンパク質はミトコンドリアや細胞質に局在する TOMM34 を介してミトコンドリアのタンパク質のシャペロンとして働く HSP70 [92] のリフォールディング効果を調節することも報告されていることから [93]、14-3-3 タンパク質が間接的に PrP のミトコンドリアへの標的化を調節している可能性もある。さらに、14-3-3 ζ の発現阻害はミトコンドリアの核周囲の集積体の形成を抑制したことから、14-3-3 γ および η によって PrP がミトコンドリアに局在した後、14-3-3 ζ 依存的にミトコンドリアの核周囲の集積体が形成されることが示唆された (図 6)。14-3-3 ζ は凝集体形成の促進を通じてミスフォールドタンパク質の除去に働くことが提唱されており [94]、ハンチントン病の病因タンパク質であるハンチンチンの凝集体の形成にも必須であることも報告されている [95]。また、ミトコンドリアはモータータンパク質とアダプタータンパク質の複合体を介して微小管上を核方向および細胞膜方向の双方向に移動することが知られている [96-101]。以上を踏まえると 14-3-3 ζ はミトコンドリア外膜上において PrP の凝集を促進し、凝集した PrP はモータータンパク質とアダプタータンパク質の複合体との結合を阻害することでミトコンドリアの細胞膜方向への移動を阻害し、ミトコンドリアを核周囲に集積させているものと考えられた。

さらに細胞質で合成されるほぼ全てのミトコンドリアタンパク質のチャネルとして機能する TOM 複合体 [102] の PrP のミトコンドリアへの標的化との関与を検討したところ、ミトコンドリア前駆タンパク質の受容体として機能する Tom70 がミトコンドリア外膜上の受容体として機能していることが明らかとなった (図 7)。ほとんどのミトコ

ンドリア前駆タンパク質のミトコンドリアへの局在には受容体による認識を必須とする [92, 103, 104]。Tom20、Tom22、Tom70 は受容体としての機能を有し、Tom20 および Tom22 は正電荷を帯びた両親媒性の α -ヘリックス構造を持つ古典的な N 末端のミトコンドリア局在配列を認識することが知られている [105-110]。一方で Tom70 は、ミトコンドリア内膜の複数回膜貫通型キャリアータンパク質をはじめとした内在性のミトコンドリア局在シグナルを認識し [106, 111]、細胞質のシャペロンである HSP70 の結合部位として機能することも知られている [92]。PrP は N 末端側に小胞体移行配列を有することから、PrP のミトコンドリアへの局在には Tom20 や Tom22 でなく、Tom70 によるミトコンドリア局在配列として機能する PrP (122-139) の認識が必須であることが示唆された。また Tom40 はミトコンドリア前駆タンパク質の輸入孔として機能する親水性チャンネルを形成し [112]、 β バレル構造の内側が前駆タンパク質の通り道として機能する [113]。しかしながら本研究では、Tom40 の発現阻害が PrP のミトコンドリアへの局在に及ぼす影響は観察されなかった。一部の Tom70 による認識を受けるミトコンドリアのタンパク質では、Tom40 を介さずともミトコンドリア外膜に局在することが報告されていることから [114-117]、PrP が同様の経路を介してミトコンドリア外膜に局在している可能性がある。一方で本研究では Tom40 を阻害したときの PrP の局在ミトコンドリア内における局在を検討していないため、PrP が Tom40 を介してミトコンドリア内部に送達される経路も存在する可能性もある。その場合には Tom40 の発現の阻害は外膜上の PrP の局在に影響を及ぼすとは考えにくいことから、ミトコンドリアの核周囲の集積体の形成にはミトコンドリア外膜上に局在した PrP のみで十分であると考えられる。

タンパク質の異常標的化は、多くの場合でタンパク質の恒常性を乱し、毒性を引き起こすことで疾患の発症に関与する [43, 118, 119]。神経変性疾患の発症には、病因タンパク質のミトコンドリアへの異常標的化が関与することが報告されており、アルツハイ

マー型認知症 (AD: alzheimer's disease) では、アミロイド前駆タンパク質のミトコンドリア上の蓄積がミトコンドリアの機能不全を引き起こし、疾患の発症に関与すると考えられている [120]。また、AD 患者の脳では、ミトコンドリアの形態変化やクリステ構造の破壊が観察されている [121]。パーキンソン病においても細胞質のタンパク質である α -シヌクレインがミトコンドリアに局在し、引き起こされるミトコンドリアの分裂・融合の阻害が神経変性の要因となり得ることが報告されている [122]。従って、本研究で見出された PrP (122-139)、14-3-3 タンパク質および Tom70 に依存的なミトコンドリアへの標的化と続発する神経細胞特異的なミトコンドリアの核周囲の集積と軸索の退縮は、神経細胞の機能障害へつながるとものと考えられ、プリオン病の急速な神経変性的一端を担うものと考えられた。

5. 小括

本章ではプリオン病の神経変性機構の解明に向け、PrP のミトコンドリアへの異常標的化機構ならびに PrP のミトコンドリアへの局在が細胞機能に及ぼす影響を明らかにした。GFP を融合させた PrP のトランケートプラスミドを構築し、蛍光顕微鏡を用いて PrP の細胞内局在を観察したところ、PrP のアミノ酸配列上の 122 番目から 139 番目までのアミノ酸がミトコンドリア局在配列として機能することを見出した。さらに PrP が局在した神経細胞のミトコンドリアは正常な細胞内分布を失い、高度に核の周囲に集積することを見出した。また、神経細胞と非神経細胞のミトコンドリアサブコンパートメントの分画を行い、PrP の局在をウェスタンブロットによって比較したところ、PrP は非神経細胞において膜間腔ならびに内膜近傍に局在するのに対し、神経細胞においては膜間腔ならびに内膜近傍に加えて、外膜にも局在していることが明らかとなった。このことから、ミトコンドリア外膜上の PrP がミトコンドリアの核周囲の集積体の形成に関与していることが示唆された。さらに RNA 干渉を用いた阻害実験により、PrP のミトコンドリアへの局在を担う細胞質側の因子として 14-3-3 γ ならびに 14-3-3 η が機能すること、ミトコンドリアの核周囲の集積体の形成には 14-3-3 ζ が必須であることが明らかとなった。また、ミトコンドリア外膜上の PrP の受容体として Tom70 が特異的に機能することを同様の RNA 干渉を用いた実験系で明らかとした。これらの結果から、PrP は 122 番目から 139 番目の 18 アミノ酸、14-3-3 γ ならびに η 、Tom70 を介してミトコンドリアに標的化し、神経細胞特異的にミトコンドリア外膜上に局在した PrP は 14-3-3 ζ 依存的にミトコンドリアを核周囲に集積させることが明らかとなった (図 8 A)。神経細胞におけるミトコンドリアの核周囲への集積は、シグナル伝達等で多量の ATP を要求する軸索末端へのエネルギー供給不全を意味し、引き起こされる軸索の退縮はプリオン病の神経変性的一端を担うものと考えられた (図 8 B)。

Antibody	Catalog Number	Source	Antibody Dilution
GFP	50430-2-AP	Proteintech (Rosemont, IL, USA)	1:1000
α -Tubulin	T6199	Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, USA)	1: 10000
Tom20	sc-11415	Santa Curuz Biotechnology (Dallas, TX, USA)	1: 5000
Tom22	11278-1-AP	Proteintech	1: 1000
Tom40	18409-1-AP	Proteintech	1: 10000
Tom70	14528-1-AP	Proteintech	1: 10000
14-3-3 β	18641	株式会社免疫生物研究所 (群馬)	1: 1000
14-3-3 γ	18647	株式会社免疫生物研究所	1: 3000
14-3-3 ϵ	18643	株式会社免疫生物研究所	1: 3000
14-3-3 ζ	sc-293415	Santa Curuz Biotechnology	1: 1000
14-3-3 η	18645	株式会社免疫生物研究所	1: 1000
14-3-3 σ	18642	株式会社免疫生物研究所	1: 1000
14-3-3 τ	10017	株式会社免疫生物研究所	1: 1000

表1: 第一章におけるウェスタンブロットで用いた抗体の型番および希釈倍率

Target gene	siRNA sequence
TOMM20	5'-GAUGCUGAAGCAGUUCAGA[dT][dT]-3'
	5'-UCUGAACUGCUUCAGCAUC[dT][dT]-3'
TOMM22	5'-GAAGUUCUUACAUGCCCAU[dT][dT]-3'
	5'-AUGGGCAUGUAAGAACUUC[dT][dT]-3'
TOMM40	5'-GCGAGUACCGUGGUUCUGA[dT][dT]-3'
	5'-UCAGAACCACGGUACUCGC[dT][dT]-3'
TOMM70A	5'-GAUAAAGGUUUGGAGCUUA[dT][dT]-3'
	5'-UAAGCUCCAACCUUUAUC[dT][dT]-3'
YWHAB	5'-CAAAGAGUACCGUGAGAAG[dT][dT]-3'
	5'-CUUCUCACGGUACUCUUUG[dT][dT]-3'
YWHAG	5'-CGGUGAAGGCAACAACUAA[dT][dT]-3'
	5'-UUAGUUGUUGCCUUCACCG[dT][dT]-3'
YWHAE	5'-GUUAAUCUGUUGUGACAUU[dT][dT]-3'
	5'-AAUGUCACAACAGAUUAAC[dT][dT]-3'
YWHAZ	5'-CGAGGUUGCUGCUGGUGAU[dT][dT]-3'
	5'-AUCACCAGCAGCAACCUCG[dT][dT]-3'
YWHAH	5'-GCUGAAUGAACCACUAUCUAA[dT][dT]-3'
	5'-AGAUAGUGGUUCAUUCAGCUC[dT][dT]-3'
YWHAS	5'-GGGAGAAGGUAGAGACCGA[dT][dT]-3'
	5'-UCGGUCUCUACCUUCUCCC[dT][dT]-3'
YWHAT	5'-CUACCAAGAGGCGUUUGAU[dT][dT]-3'
	5'-AUCAAACGCCUCUUGGUAG[dT][dT]-3'

表2: 第一章におけるRNA干渉に用いたsiRNAの配列

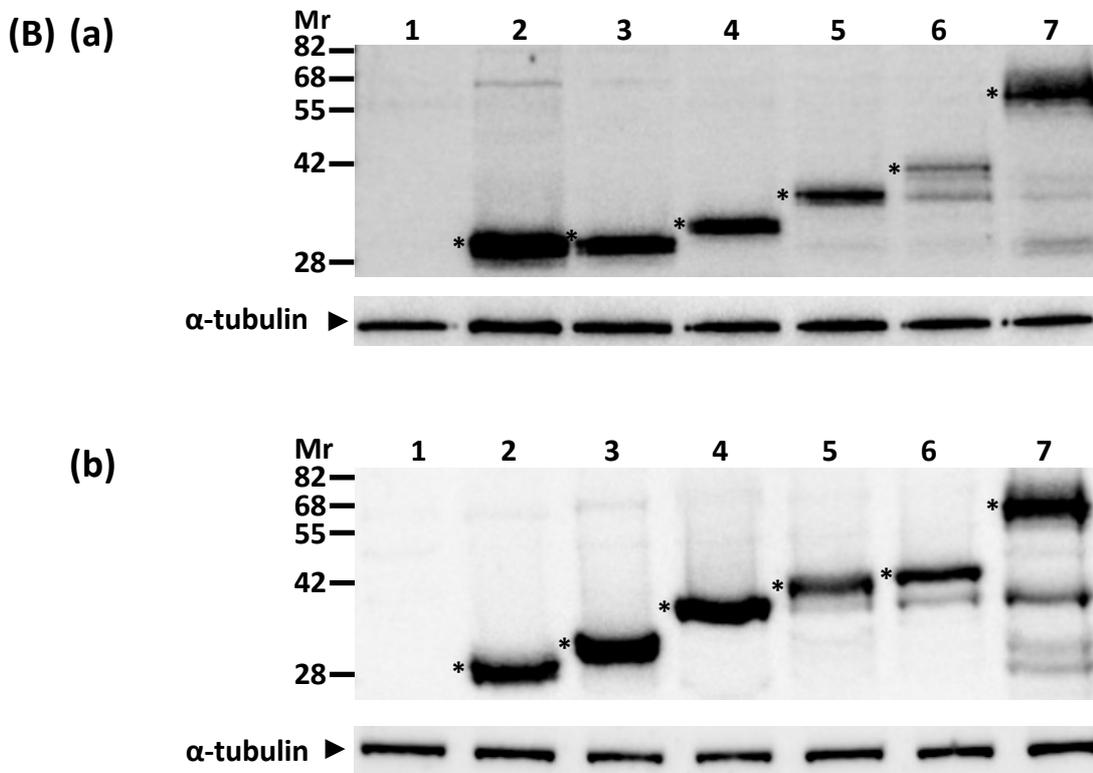
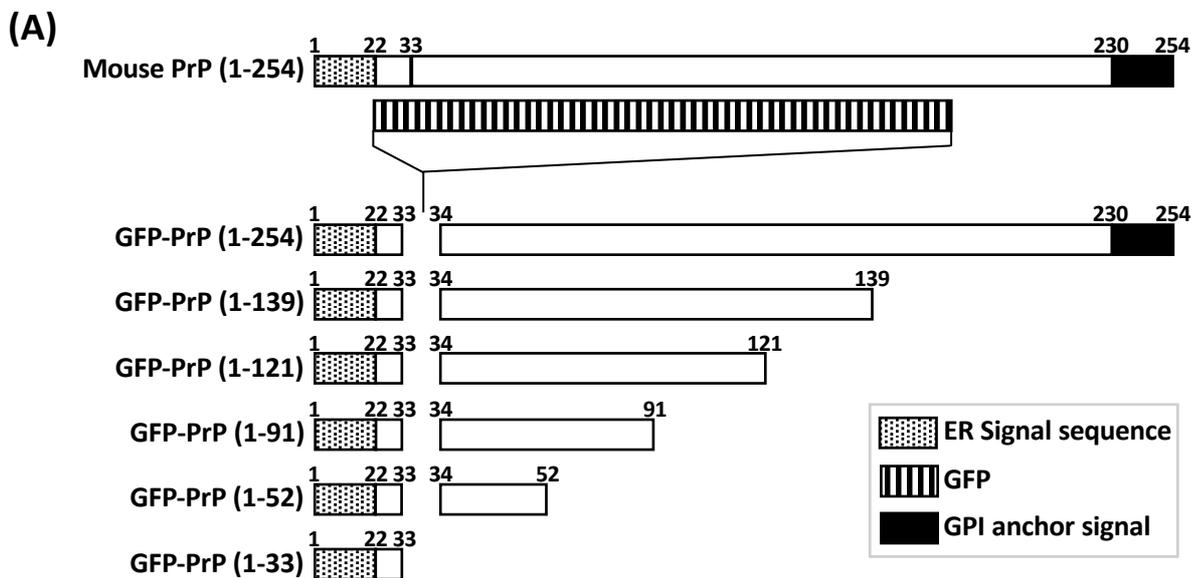


図1: GFP融合-PrPトランケートプラスミドの構築とHeLa細胞およびN2a細胞での発現

(A) GFP融合-PrPトランケートプラスミドの模式図。(B) HeLa細胞 (a) およびN2a細胞 (b) におけるトランケートプラスミドの発現を抗GFP抗体を用いたウェスタンブロットにより検出した。アスタリスクは発現させたGFP融合-PrPのバンドを示し、他のバンドは非特異的のバンドである。 α -Tubulinを内在性のコントロールとして使用した。レーン1: 遺伝子導入なし、レーン2: PrP (1-33)、レーン3: PrP (1-52)、レーン4: PrP (1-91)、レーン5: PrP (1-121)、レーン6: PrP (1-139)、レーン7: PrP (1-254) を示す。

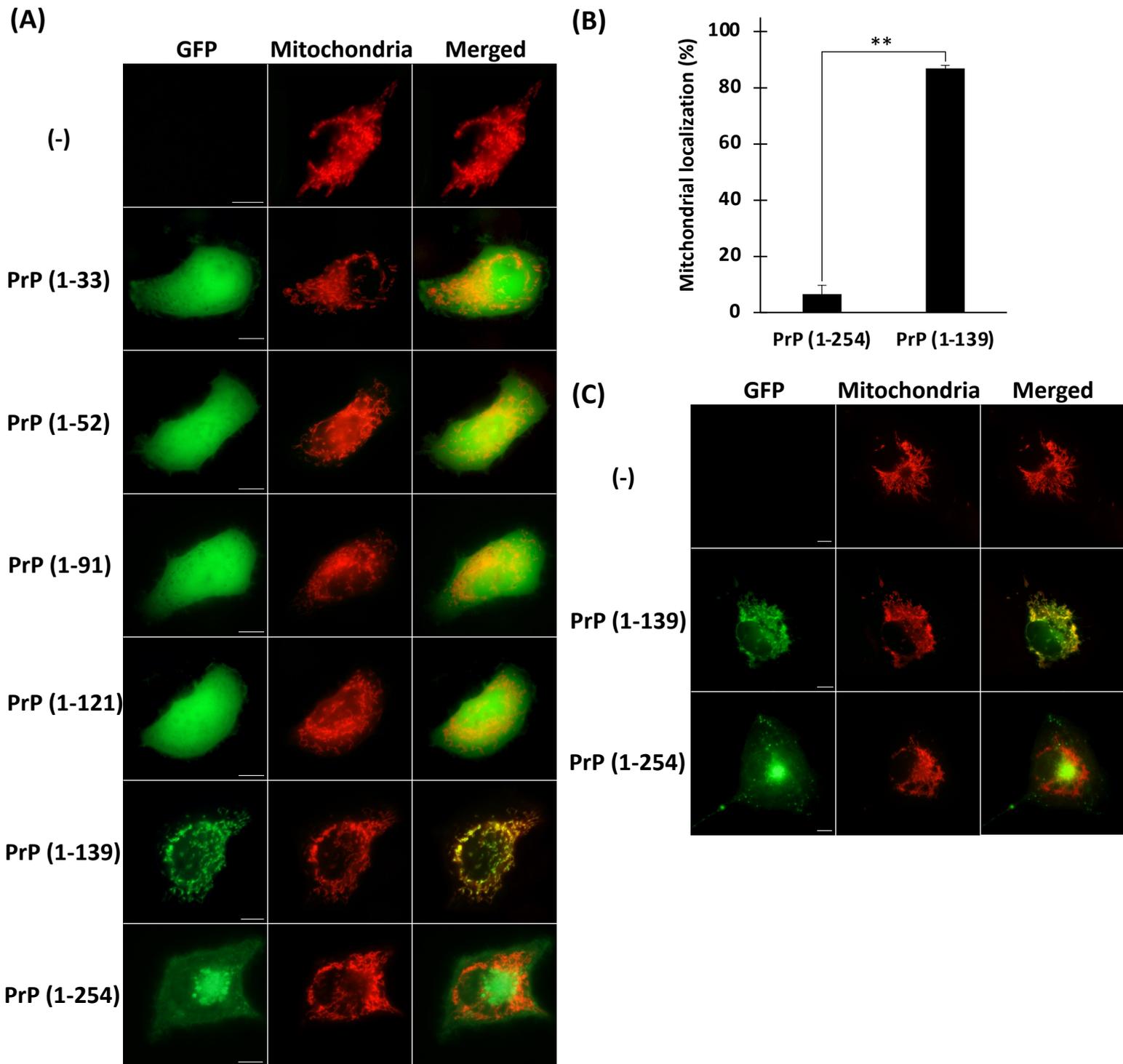


図2: PrP (122-139) はミトコンドリアへの局在に關与する

(A) HeLa細胞におけるトランケートPrPの細胞内局在。遺伝子未導入細胞ではGFPのシグナルは觀察されなかつた。全長のPrP (1-254) はゴルジ体と細胞膜に局在した。PrP (1-33), (1-52), (1-91), (1-121) は細胞質へ局在した。一方で、PrP (1-139) はミトコンドリアに局在し、MitoTracker と同様の局在を示した。ミトコンドリアの形態と細胞内分布はコントロールと同様であつた。スケールバーは10 μm をあらわす。(B) HeLa細胞においてPrPがミトコンドリアへ局在した細胞数の定量。エラーバーは標準偏差を示す。n=3。 $**p < 0.01$ 。(C) COS-7細胞におけるPrP (1-139) および PrP (1-254) の細胞内局在。

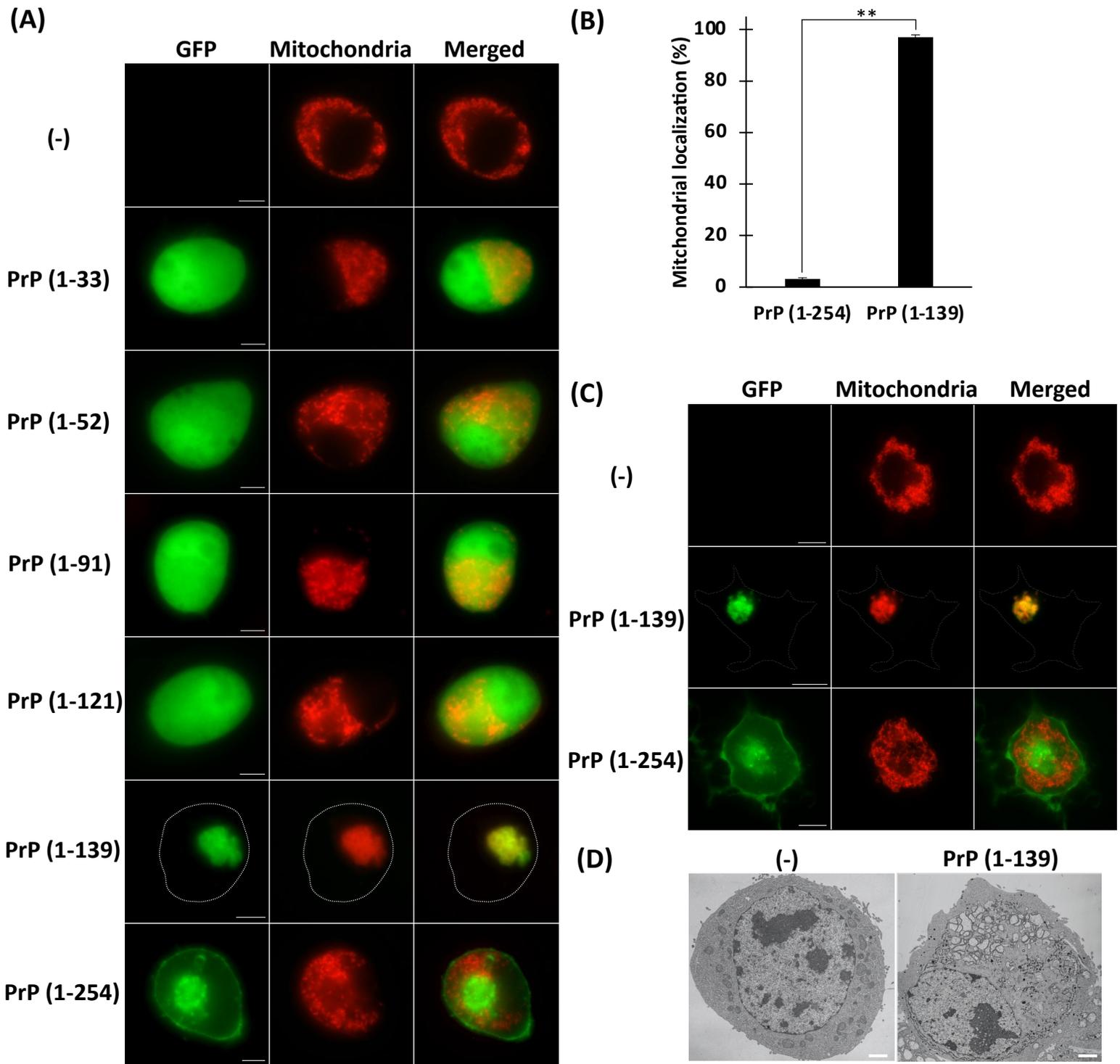


図3: 神経細胞においてミトコンドリアに局在したPrPはミトコンドリアを核周囲に集積させる

(A) N2a 細胞におけるトランケートPrPの細胞内局在。全長のPrP (1-254) およびPrP (1-33), (1-52), (1-91), (1-121) はHeLa細胞と同様の細胞内局在を示した。一方でPrP (1-139) はミトコンドリアに局在し、PrP (1-139) が局在したミトコンドリアは細胞膜方向へ向かう順方向の移動が阻害された核周囲の集積体として観察された。スケールバーは5 μm を示す。点線は細胞形態を表す。

(B) N2a細胞においてPrP がミトコンドリアへ局在した細胞数の定量。n=3。エラーバーは標準偏差を示す。** $p < 0.01$ 。

(C) ScN2a 細胞におけるPrP (1-139) の細胞内局在。遺伝子未導入細胞ではGFPのシグナルは観察されなかった。全長のPrP (1-254) は細胞膜とゴルジ体に局在した。PrP (1-139) はミトコンドリアに局在し、N2a細胞と同様にミトコンドリアが核周囲に集積した。スケールバーは10 μm を示す。

(D) N2a細胞において核周囲に集積したミトコンドリアの透過型電子顕微鏡観察像。コントロールのミトコンドリアは細胞全体に局在した一方で、PrP (1-139) が局在したミトコンドリアは核周囲に集積した。スケールバーは1 μm を示す。

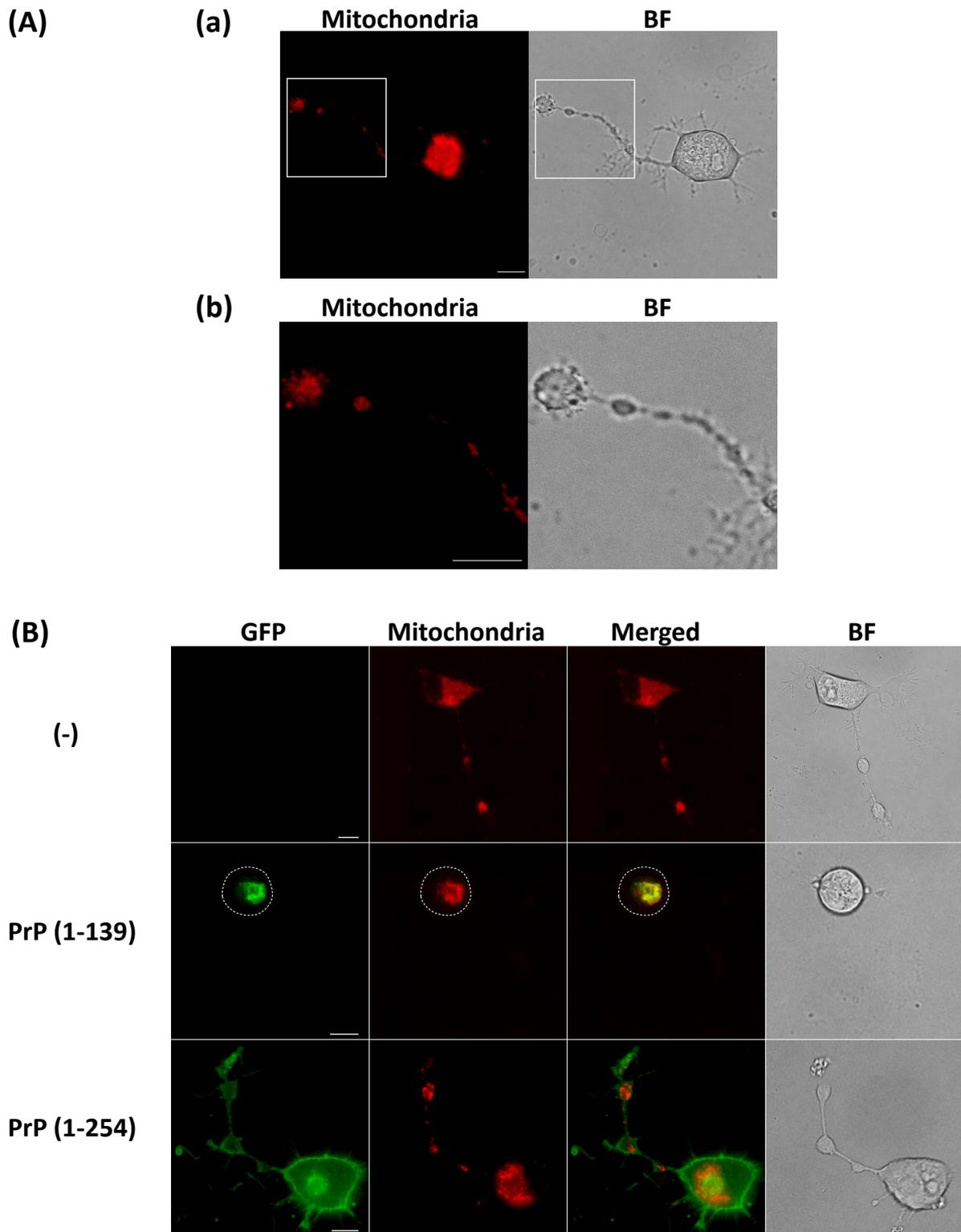


図4: ミトコンドリアの細胞内分布の破綻は神経細胞において軸索の退縮を惹起する

(A) N2a細胞を血清不含培地で48時間培養することで神経細胞への分化を誘導した。(a) MitoTrackerにより染色したミトコンドリアおよび明視野像。(b) (a) における拡大図。神経細胞への分化誘導により軸索の伸長および軸索に沿ったミトコンドリアの局在を確認した。(B) 神経細胞への分化を誘導したN2a細胞にトランケートPrPを導入し、PrPとミトコンドリアの細胞内局在および細胞形態を観察した。全長のPrP (1-254) は細胞膜および軸索に沿って局在し、ミトコンドリアの細胞内局在と軸索の形態はコントロールと同様であった。一方でPrP (1-139) はミトコンドリアに局在し、ミトコンドリアは核周囲に集積した。さらにミトコンドリアの軸索への供給不全により、伸長した軸索が退縮した。点線は細胞形態を表す

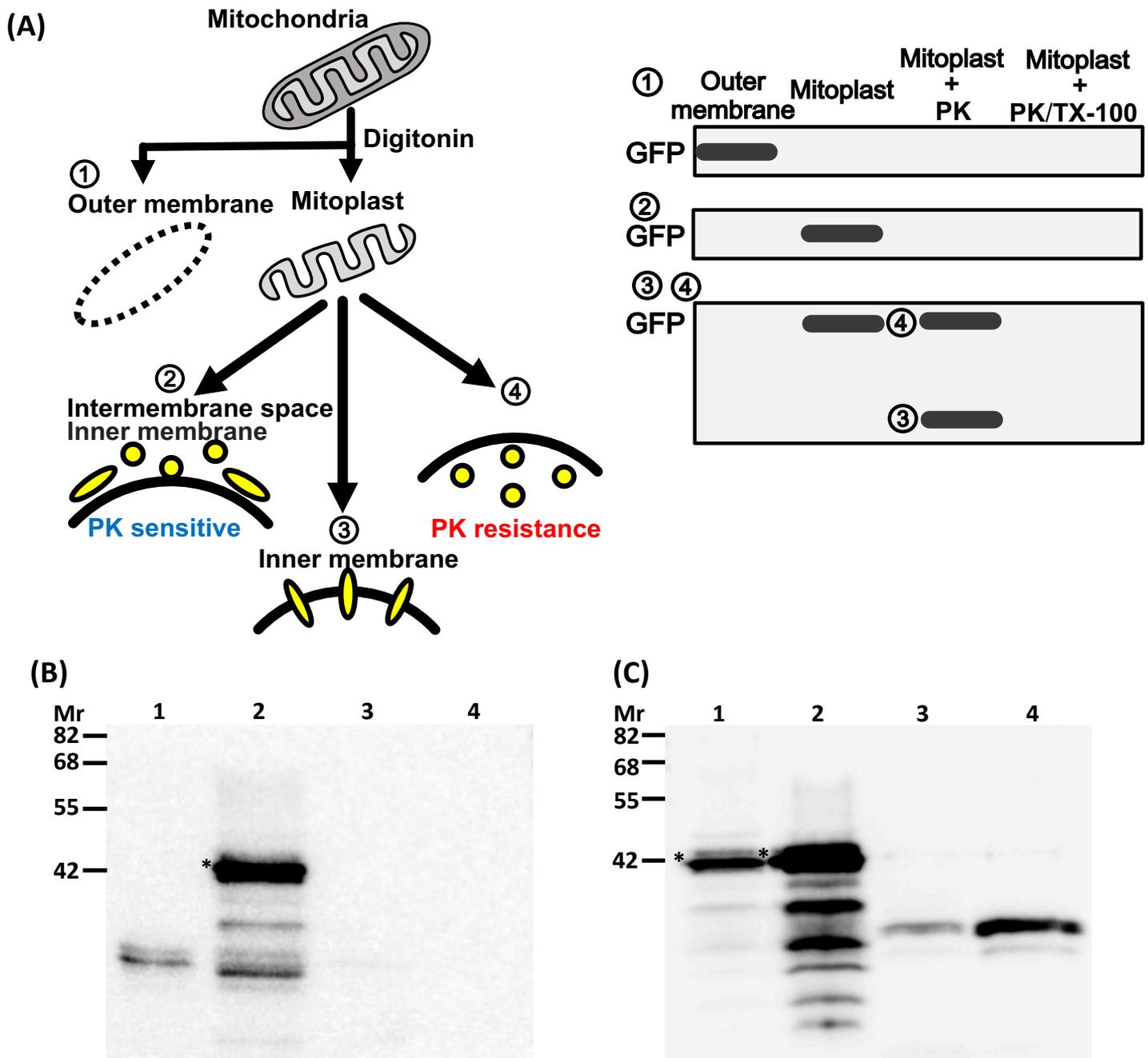


図5: 神経細胞特異的なミトコンドリア外膜上のPrPはミトコンドリアを核周囲に集積させる

(A) ミトコンドリアサブコンパートメントの生化学的単離法の模式図。ミトコンドリアサブコンパートメントにおけるPrP (1-139)の局在をウェスタンブロットにて検出した。(B) HeLa細胞では、PrP (1-139)はマイトプラスト画分に検出された。(C) N2a細胞ではマイトプラスト画分に加えて外膜画分にもPrP (1-139)が検出された。アスタリスクのバンドはPrP (1-139)を示し、他のバンドは非特異である。レーン1: 外膜画分、レーン2: マイトプラスト画分、レーン3: マトリックス画分、レーン4: TritonX-100で破裂させたマイトプラスト画分。

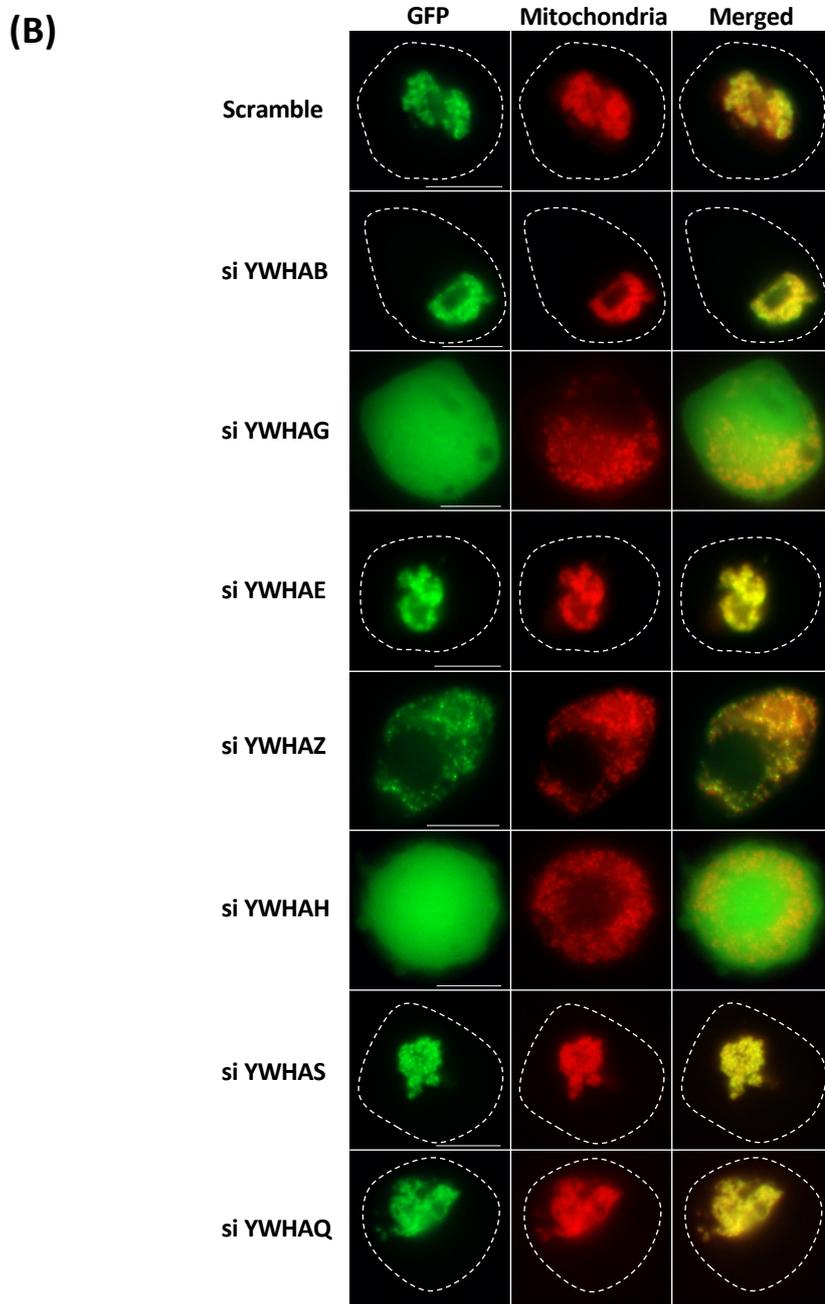
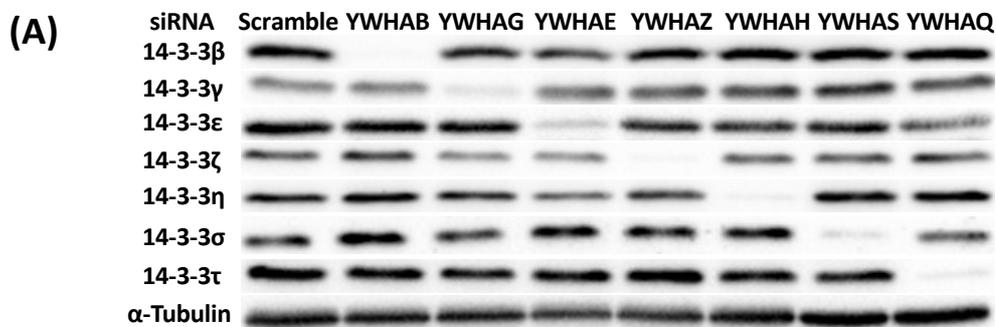


図6: 14-3-3タンパク質はPrPのミトコンドリアへの局在と核周囲への集積に関与する

(A) 14-3-3タンパク質を構成する7アイソフォームに対する特異的なsiRNAをN2a細胞に導入し、ウェスタンブロットにより特異的なタンパク質発現阻害を確認した。(B) 14-3-3タンパク質の発現を阻害したときのPrP (1-139) の局在を蛍光顕微鏡を用いて観察した。14-3-3 β , ϵ , σ , τ の発現を阻害したときのPrP (1-139) の局在およびミトコンドリアの細胞内局在はスクランブルコントロールと同様であった。一方で14-3-3 γ および η を阻害したときPrP (1-139) は細胞質に局在し、ミトコンドリアの細胞内局在も正常な局在を示した。さらに14-3-3 ζ を阻害したときPrP (1-139) はミトコンドリアに局在するもののミトコンドリアは正常な細胞内分布を示した。スケールバーは10 μ mをあらわす。破線は細胞形態を表す。

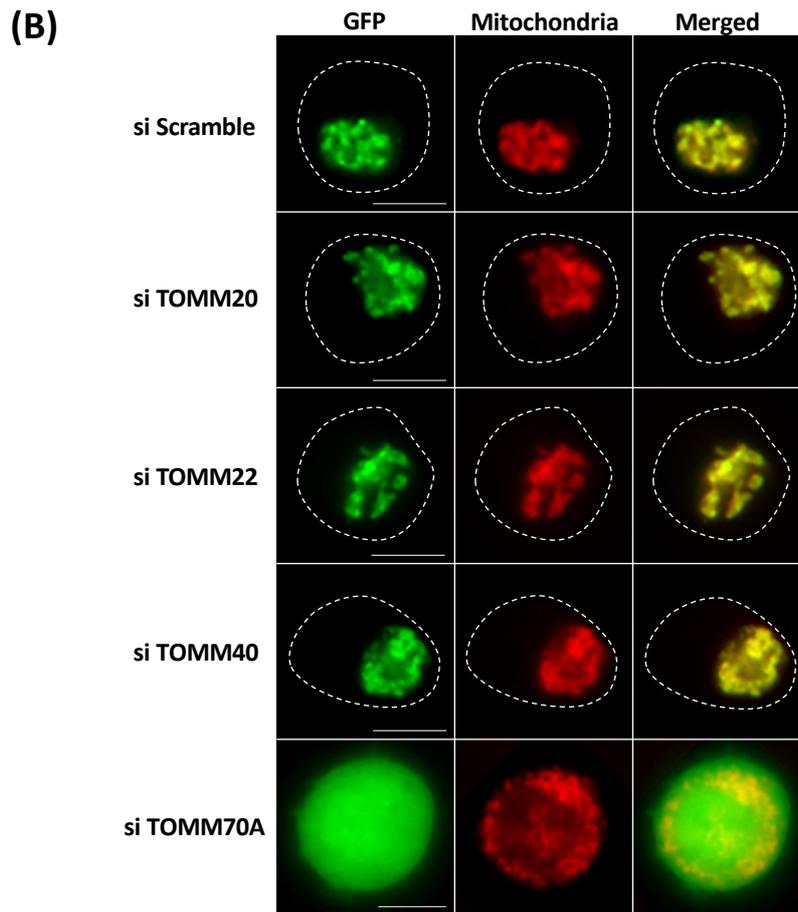
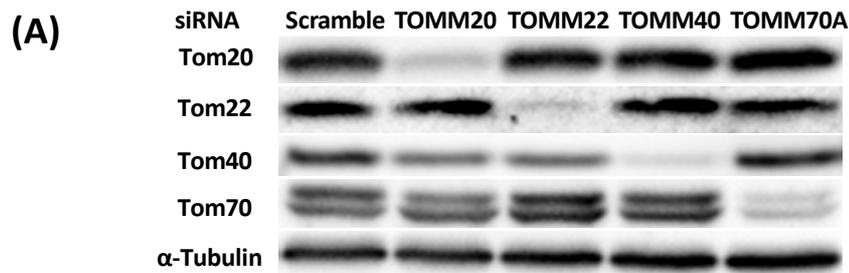


図7: Tom70 はミトコンドリア外膜上のPrPの受容体として機能する

(A) ミトコンドリア前駆タンパク質の受容体として機能するTom20、Tom22、Tom70 およびミトコンドリア外膜透過装置として機能するTom40に対するsiRNAをN2a細胞に導入し、ウェスタンブロットにより特異的なタンパク質発現阻害を確認した。

(B) N2a細胞にsiRNAでTom複合体構成タンパク質の発現を阻害したときのPrP (1-139) の局在を蛍光顕微鏡を用いて観察した。Tom20、Tom22、Tom40の発現阻害したときのPrP (1-139) の局在およびミトコンドリアの細胞内局在はスクランブルコントロールと同様であった。一方でTom70を阻害したときPrP (1-139) は細胞質に局在し、ミトコンドリアの細胞内局在も正常な局在を示した。スケールバーは10 μ mをあらわす。点線は細胞形態を表す

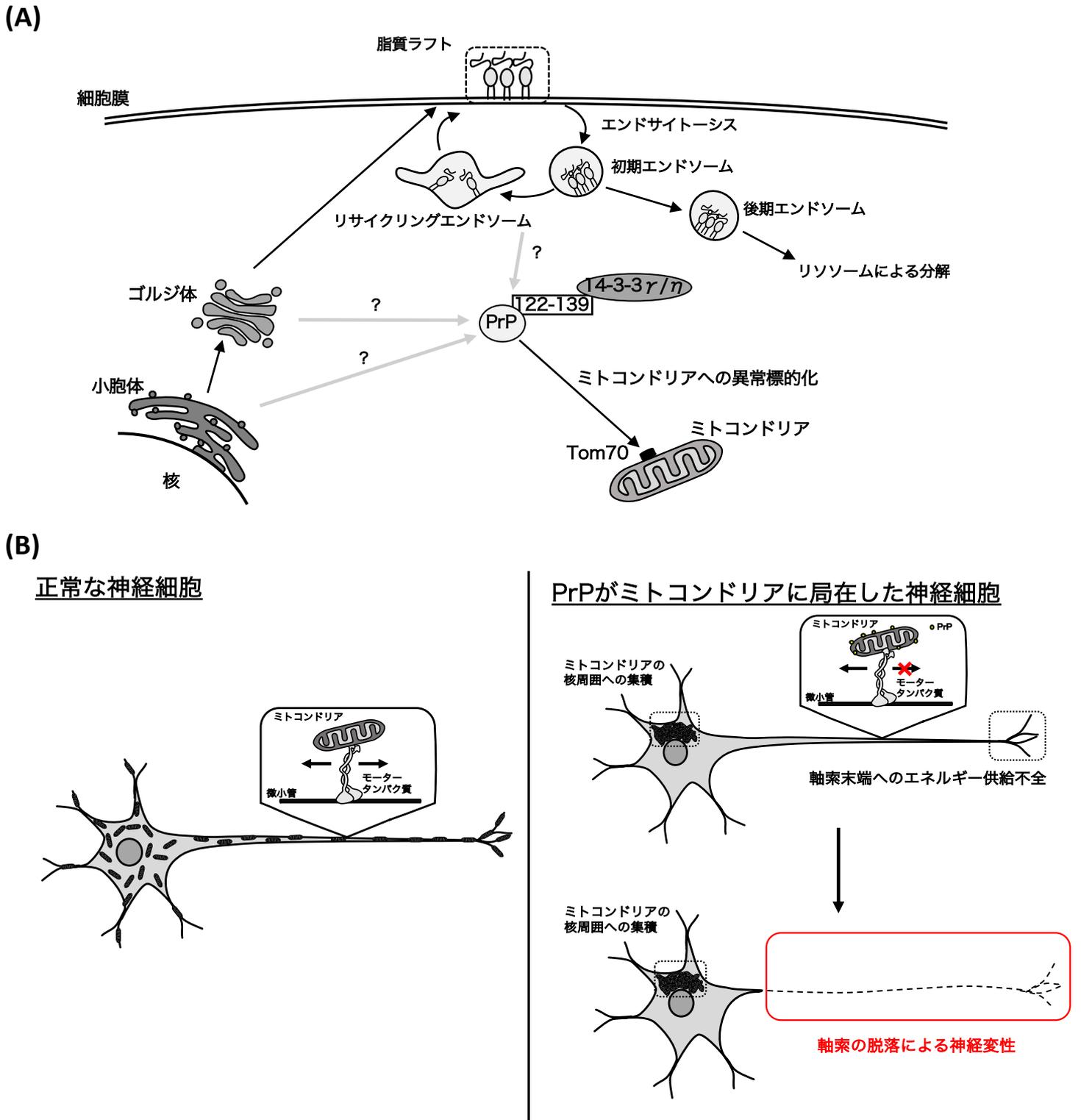


図8: 第一章の概念図

(A) PrPのミトコンドリアへの標的化機構 (B) PrPのミトコンドリアへの局在が及ぼす影響

<第二章>

吸入麻酔薬前駆体ヘキサフルオロ-2-プロパノールの プリオン病治療薬への応用に向けた基礎的研究

1. 序論

諸言で述べたとおり、プリオン病は何らかの理由で PrP^C が PrP^{Sc} へ構造変換し、中枢神経系に蓄積することで発症が惹起されると考えられている [1]。第一章で見出されたミトコンドリア局在配列である PrP (122-139) 中の 138 および 139 番目のアミノ酸も遺伝性プリオン病における PrP アミロイド線維の形成に重要な役割を担うことが報告されており [123]、PrP のミトコンドリアへの異所性の局在と PrP の高次構造変換の関与が考えられる。PrP^{Sc} の蓄積が発症の要因となることから、PrP^{Sc} の産生阻害を目的とした様々な薬剤がプリオン病治療薬として検討されてきた。しかしながら薬剤の継続的な投与がもたらす薬剤耐性を有したプリオン株の出現が問題となっている [124]。例として培養細胞を用いた実験系において強力な抗プリオン活性をもつ化合物として同定された抗マラリア薬であるキナクリンのプリオン感染マウスへの投与は、一過性に PrP^{Sc} のレベルを低下させるものの、継続的な投与は PrP^{Sc} のレベルの回復をもたらし、結果として生存期間の延長が観察されないこと報告されている。さらに薬剤投与マウスの脳内に残存した PrP^{Sc} の生化学的性状や組織中の局在が薬剤未投与マウスの PrP^{Sc} と異なることから、キナクリンの継続的な投与は新たに薬剤耐性を持ったプリオン株の蓄積につながることを示されている [125]。同様に Compound B (Cpd-B) はプリオン感染マウスの生存期間を延長することが報告されているが、Lu らは Cpd-B の継続的な投与は PrP^{Sc} のグアニジン塩酸塩に対する安定性の向上をもたらすこと、PrP^{Sc} の組織中の局在を変化させることから、プリオン株の形質転換を引き起こすことを報告している [126]。Berry らは、2-アミノチアゾール化合物である IND24 はプリオン感染マウスの生存期間の延長をもたらすが、IND24 投与マウス由来の脳ホモジネートは、CAD5 細

胞に対して感染性を持ったプリオンを含むことを報告している。さらに IND24 処理マウス由来の脳抽出液を処理した CAD5 細胞の PrP^{Sc} は IND24 のみならず、キナクリンおよび Cpd-B に耐性をもった多剤耐性のプリオン株であることを報告している [124]。このような問題から、今日において臨床的に十分な効果が得られた薬剤が存在せず、プリオン病は致死性疾患である。

セボフルラン (フルオロメチル-1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロピルエーテル) は酸ハロゲン化物に代謝されないため、他の吸入麻酔薬と比べて比較的副作用が少なく、臨床的に広く用いられる麻酔薬である [127, 128]。1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール (HFIP) はセボフルランの前駆体かつ代謝産物でもあり、2つのトリフルオロメチル基を有するフッ素系アルコールである。シトクロム P-450 (CYP2E1) による第 I 相代謝反応で酸化を受けたセボフルランは、フッ化イオンと HFIP へと代謝される。さらに HFIP はウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素による第 II 相代謝反応によりグルクロン酸抱合を受け、HFIP-グルクロニドとして代謝され、尿中へ排泄される [129, 130]。

現在のところ臨床的な濃度での HFIP の毒性は報告されていない。一方で、HFIP はエンドトキシン刺激による炎症メディエーターの分泌を抑制することで、腹膜炎敗血症モデルマウスの生存率を向上させることが報告されている [131]。また、HFIP をはじめとしたフッ素系アルコールは、タンパク質の β -シート構造を破壊して α -ヘリックス構造を誘導する性質から、タンパク質溶液中の分子間相互作用の変化をもたらすエフェクター分子として作用することが知られている [132]。Viera らは、A β (1-40) 線維に対して HFIP が 3 つのフッ素原子を含むテトラフルオロエタノールと比べて強い α -ヘリックス誘導活性を持つことから、フッ素系アルコールのヘリックス誘導活性がフッ素化率に依存することを報告している [133]。この性質を利用し、HFIP は A β ペプチドのようなペプチド凝集体を溶解する溶媒として用いられている [134-137]。

PrP^{Sc}は一様な構造でなく、多くの構造から構成されていると考えられている。プリオン病の治療薬として、PrP^CからPrP^{Sc}への構造変換を阻害する化合物の同定が試みられているが、上述のとおりこれらの多くの薬剤は薬剤耐性を持ったプリオン株を生じてしまうことが問題であった [138]。一方でHFIPは強固な α -ヘリックス誘導活性を有するため、PrP^{Sc}をPrP^Cへと誘導しPrP^{Sc}そのものの構造を正常化することが可能と考えられる。したがって従来検討されてきた化合物の問題点であった薬剤耐性プリオン株の発生という問題点を解決することが期待される。

以上を踏まえて第二章では、組換えタンパク質より作成したPrP線維およびプリオン病の*in vitro*モデルとして確立されているスクレイピー持続感染マウス神経芽細胞腫由来細胞株 [139, 140] を用いてHFIPのプリオン病治療薬への応用に向けた基礎的研究を行った。

2. 材料及び方法

2-1. 細胞培養

マウス神経芽細胞腫由来 Neuro2a (N2a) 細胞、アフリカミドリザル腎臓由来 COS-7 細胞は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) より購入した。スクレイピー-Chandler 株を N2a 細胞に持続感染させた ScN2a 細胞は北海道大学 大学院獣医学研究院 獣医衛生学教室の堀内基広教授の分与を受けた。N2a 細胞および ScN2a 細胞は Eagle's Minimum Essential Medium (Cat. No. 051-07615、富士フィルム和光純薬株式会社、大阪) 、COS-7 細胞は Dulbecco's modified Eagle's Medium (Cat. No. 043-30085、富士フィルム和光純薬株式会社) に終濃度 10% のウシ胎児血清および 100 units/mL のペニシリン、100 µg/mL のストレプトマイシンを添加し、5%CO₂、37°C、加湿条件で培養した。

2-2. 組換え PrP の発現と精製

透過型電子顕微鏡観察に用いた全長ハムスター PrP (23-231) (Cat. No. 03-030) は Thermo Fisher Scientific Prionics AG (Schlieren, Switzerland) より購入し、1 µg/µL となるように PBS に溶解した。円偏光二色性 (CD: Circular Dichroism) スペクトルの測定には透過型電子顕微鏡観察と比較して多量の基質が必要であったため、マウス組換え PrP を大腸菌に発現させ、精製したものを試料とした。マウスの PrP の全長である 23 番目から 230 番目までのアミノ酸をコードする PrP (23-230) の発現ベクター [141] を *E. coli* BL21 (DE3) 株 (Cat. No. 69450, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) に遺伝子導入し、Luria-Bertani Broth (Cat. No. 10855001, Thermo Fisher Scientific) を用いて 37°C で 18 時間培養した。さらに形質転換された大腸菌を 0.4% のグリセロールを含む Terrific Broth (Cat. No. 227110022, Thermo Fisher Scientific) 中に接種し、37°C で 3 時間培養した。次いで PrP の発現を誘導するた

め、終濃度 500 μM となるように Isopropyl- β -D (-) -thiogalactopyranoside (Cat. No. 096-05143, 富士フイルム和光純薬株式会社) を添加し、30°C, 120 rpm で震盪しながら 3 時間培養した。大腸菌中で封入体として発現させた PrP は、封入体を可溶化バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 8 M Urea, 150 mM NaCl, 500 μM Phenylmethylsulfonyl fluoride) を用いて可溶化し、遠心分離の後に PrP のオクタペプチドリピート領域がニッケルイオンに対する親和性を持つ性質を利用し [142]、ニッケルキレートカラム (Cat. No. 17524801, Cytiva, Marlborough, MA, USA) を用いて精製した。ニッケルキレートカラムアプライサンプルをあらかじめ可溶化バッファーにて平衡化したカラムにアプライした。可溶化バッファーでカラムを洗浄した後、溶出バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 8 M Urea, 150 mM NaCl, 500 μM Phenylmethylsulfonyl fluoride, 500 mM Imidazole) による Imidazole のステップワイズにて溶出した。各精製分画に含まれるタンパク質を SDS-PAGE と CBB 染色にて確認し、目的のタンパク質を含む分画を回収し試料として用いた。

2-3. 試験管内での PrP および A β (1-40) 線維の作成

透過型電子顕微鏡観察に使用したハムスター組換え PrP および CD のスペクトル測定に使用したマウス組換え PrP はそれぞれ PBS および 5 mM Tris-HCl (pH 7.5) に溶解し、静置することで線維を形成させた。A β -peptide (Human, 1-40) (Cat. No. 4307-v, 株式会社ペプチド研究所、大阪) は 0.05% のアンモニウム水 (Cat. No. 012-03143, 富士フイルム和光純薬株式会社) を用いて 500 μM となるように溶解した。透過型電子顕微鏡観察に用いた A β (1-40) は終濃度 100 μM となるように 50 mM のリン酸ナトリウム水溶液 (pH 7.5) で希釈し、150 μL の溶液を 2 mL チューブ中で MicroMixer E-36 (タイテック株式会社、埼玉) を用いて 1,500 rpm で室温で 16 時間震盪することで線維を形成させた。CD スペクトルの測定に用いた A β (1-40) は 100

μM となるように PBS に希釈し、300 μL を遠沈管中で BR-23FP (タイテック株式会社) を用いて 37°C で 250 rpm で 12 時間震盪することで線維を形成させた。

2-4. 透過型電子顕微鏡観察

組換え PrP および A β (1-40) は終濃度 14.6 μM に希釈し、HFIP (セントラル硝子株式会社) を添加して 37°C で 24 時間インキュベートした。3 μL の試料をホルムバルおよびカーボン蒸着させたグリッドに添加した。次いで試料と等量の 1%Eu-Preyssler 型リンタングステートカリウム塩 (Cat. No. 166-2789、富士フイルム和光純薬株式会社) をグリッドに添加し、ネガティブ染色を行った。グリッドを乾燥させた後、透過型電子顕微鏡 Titan Cubed G2 60-300 (FEI Group, Hillsboro, Oregon, USA) を用いて画像を取得した。

2-5. 円偏光二色性スペクトル測定

マウス組換え PrP を 5 mM Tris-HCl (pH 7.5) にて溶解し、HFIP を室温で 3 時間処理し、円二色性分散計 (J-820、日本分光株式会社、東京) を用いて CD スペクトルを測定し、二次構造解析プログラム BeStSel [143] を用いて解析した。

2-6. プロテアーゼ耐性試験

ScN2a 細胞を 6 well プレートに 1×10^6 の濃度で播種し一晩培養した後、HFIP (0-20 mM) 含有培地に交換し、24 時間培養した。Well あたり 500 μL の RIPA バッファー (Cat. No. 188-02453、富士フイルム和光純薬株式会社) を添加し、氷上で 1 分間インキュベートすることでタンパク質を抽出した。次いで 850 \times G で 10 分間、4°C で遠心することで、上清を可溶化タンパク質画分として回収した。サンプル中に含まれるタンパク質濃度は、Total Protein Quantitation Kit, Bradford Ultra (Cat. No. BFU05L,

Novexin Ltd., Cambridge, UK) を用いて添付取扱説明書に従って測定した。100 µg の総タンパク質を 10 µg/mL の Proteinase K (PK) (Cat. No. 169-212041、富士フィルム和光純薬工業株式会社) で 37°C で 30 分間処理した。次いでプロテアーゼ阻害剤 (Cat. No. 25955-24, ナカライテスク株式会社、京都) を添加し、室温で 5 分間攪拌することで、PK の反応を停止させた。PK の分解に対して抵抗性を持つ PrP が易沈殿性である性質を利用し、20,000×G で 20 分間、4°C の遠心で沈殿した画分を PK 耐性画分とした。

2-7. ウェスタンブロット

ウェスタンブロットは第一章と同様のプロトコルで実施した。PrP の検出には一次抗体としてマウス抗 PrP 抗体 Clone SAF-83 (Cat. No. A03207, Bertin Bioreagent, Montigny le Bretonneux, France) を用い、PBS-T で 1,000 倍希釈し室温で一晩反応させた。二次抗体は HRP 標識-抗マウス IgG (H+L) (Cat. No. W4021, Promega Co., Madison, WI, USA) を 5,000 倍希釈で使用した。バンド強度は Image J (NIH, Bethesda, MD) を用いて定量した。

2-8. 蛍光免疫染色

蛍光免疫染色は八谷らの既報のとおり実施した [54]。Ca²⁺および Mg²⁺を含む PBS (PBS (+)) で洗浄した後、10% (v/v) のホルムアルデヒド (Cat. No. 16222-55、ナカライテスク) を含む PBS (+) を添加し、室温で 30 分間インキュベートすることで細胞を固定した。PBS (-) で 4 回洗浄した後、0.1% の TritonX-100 を含む PBS (-) を添加し、室温で 5 分間インキュベートすることで、細胞膜を透過させた。次いで 10% のウシ胎児血清を含む PBS (-) を添加し、室温で 30 分間反応させることでブロッキングを行った。さらにウサギ抗 PrP ペプチド抗体 (PrP 76-90) [54] を PBS (-) で 200 倍

希釈、マウス抗 α -Tubulin 抗体 (Cat. No. T6119, Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, USA) を PBS (-) で 500 倍希釈して添加し、4°C で一晩インキュベートした。PBS (-) で 4 回洗浄した後、PBS (-) で 200 倍希釈した Alexa Fluor® Plus 488 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Cat. No. A32731, Thermo Fisher Scientific) および PBS (-) で 1,000 倍希釈した Alexa Fluor® 594 標識抗マウス IgG 抗体 (Cat. No. A11032, Thermo Fisher Scientific) を添加し、室温で 2.5 時間インキュベートした。PBS (-) を用いて室温で 4 回洗浄し、SlowFade™ Diamond Antifade Mountant (Cat. No. S36963, Thermo Fisher Scientific) を用いて封入した。蛍光画像は蛍光顕微鏡 IX73 (オリンパス株式会社、東京) を用いて取得した。微小管上に局在した PrP の数は 3 μ m の微小管を 1 単位として計数し、HFIP 未添加の細胞に局在した PrP の数を 100%として示した。

2-9. JC-1 染色

JC-1 (Cat. No. 106-00131, 富士フイルム和光純薬株式会社) を終濃度 5 μ g/mL で N2a 細胞および ScN2a 細胞の培地に添加し、37°C で 30 分間インキュベートした。インキュベート後細胞を洗浄し、フェノールレッド不含 L-15 培地 (Cat. No. 21083027, Thermo Fisher Scientific) に交換した。蛍光画像は IX73 蛍光顕微鏡を用いて取得した。

2-10. クリスタルバイオレット染色

HFIP の細胞毒性は、クリスタルバイオレットによる生細胞の染色で評価した。1 \times 10⁶ の細胞を 6 well プレートに播種し、一晩インキュベートした。HFIP (1-50 mM) を含む培地に交換し、24 時間インキュベートした。HFIP の処理後、100%のメタノールで 30 分間処理することで細胞を固定し、0.05%のクリスタルバイオレット溶液

(Cat. No. 038-04862、富士フイルム和光純薬株式会社) で 30 分間生細胞を染色した。染色された細胞画像は CKX31 顕微鏡 (オリンパス株式会社) を用いて取得し、染色陽性面積は ImageJ を用いて定量した。

2-11. 統計学的解析

統計学的解析は、3-5 回の独立した試行に基づき平均値と標準偏差 (SD) を算出した。群間の有為差は F 検定による母分散の比較および t 検定により検定し、危険率が 0.05 未満の際に有意差ありとした。

3. 結果

3-1. PrP および A β 線維におよぼす HFIP の影響

組換えタンパク質より作成した PrP 線維に及ぼす HFIP の影響を観察するため、ネガティブ染色した組換えタンパク質の透過型電子顕微鏡による観察を行った。PBS を添加し、HFIP の非存在下で 24 時間インキュベートしたところ、PrP 線維は分岐のない直線状の構造を形成した (図 9 A (a)-(c), 拡大図 (d)-(f))。一方で 10 mM の HFIP を添加し、37°C で 24 時間インキュベートすると、PrP 線維の直線状の構造は三叉の構造に変化した (図 9 A (g)-(i), 拡大図 (j)-(l))。さらに 20 mM の HFIP を添加すると、線維構造が完全に消失し、規則構造を持たないアモルファス様の凝集体へと変化した (図 9 A (m)-(o), 拡大図 (p)-(r))。以上の結果から、HFIP は PrP に劇的な高次構造変化活性を持つことが示唆された。PrP に対し、A β (1-40) の線維構造 (図 9 B (a)-(f)) は HFIP の添加により変化しなかったものの、濃度依存的にアミロイド線維どうしの凝集が促進された (図 9 B (g)-(r))。さらに HFIP を処理した PrP および A β (1-40) 線維の二次構造を CD スペクトルの測定で推定した。CD スペクトルの測定では、透過型電子顕微鏡観察に用いたタンパク質濃度での測定が困難であったため、高濃度の基質および HFIP を用いてスペクトルの測定を行った。PrP の β -シート構造は HFIP の濃度依存的に α -ヘリックスに豊富な構造へと変化した一方で (図 9 C (a))、A β (1-40) の構造は、2.45 M の HFIP を添加するまで影響がなかった (図 9 C (b))。以上の結果から、HFIP が PrP と A β (1-40) 線維に対して異なる影響を及ぼすことが示唆された。

3-2. HFIP は ScN2a 細胞における PrP のプロテアーゼ抵抗性を減弱させる

PrP^C はタンパク質分解酵素である PK によって容易に分解される一方で、PrP^{Sc} は部分的な抵抗性を有する。PrP^{Sc} の形成阻害はプリオン病の治療介入の主な標的であり、プリオン持続感染細胞株である ScN2a 細胞は PrP^{Sc} を持続産生することから、化合物

の抗プリオン活性を評価する *in vitro* のモデルとして採用されている [144]。そこで ScN2a 細胞に HFIP を添加し、PK に対する感受性を評価することで、HFIP の抗プリオン活性を測定した。PrP^{Sc} の PK 抵抗性は、5-10 mM の HFIP を添加し、24 時間インキュベートときには変化しなかったものの、15 mM の添加ではコントロールと比較して PrP^{Sc} の PK 抵抗性のバンド強度が 60% に減少した。さらに HFIP の濃度を 20 mM まで上昇させると、PK 抵抗性の PrP のバンド強度はコントロールと比較して 20% 程度にまで減少した (図 10)。以上の結果から、HFIP は ScN2a 細胞における PrP のプロテアーゼ抵抗性を減弱させることが示唆された。

3-3. HFIP は PrP の細胞内局在およびミトコンドリアの膜電位に影響を与えない

PrP^{Sc} のプロテアーゼに対する感受性の変化が、PrP^{Sc} の構造変化を反映していることを踏まえると、PrP が細胞内に存在する様々な分子シャペロンに認識される可能性がある。その場合、細胞内のタンパク質品質管理機構により、PrP の細胞内分布が変化する可能性がある [145]。そこで、HFIP 存在下の内在性 PrP の細胞内局在の変化について蛍光免疫染色を用いて検討した (図 11 A)。細胞膜への輸送過程にある内在性の PrP は微小管上に局在し、他のカーゴタンパク質と同様に微小管に直接結合するのではなく、モータータンパク質やアダプタータンパク質を介して、細胞膜方向および核方向へ移動する [52, 54]。PrP と微小管の細胞内局在を観察したところ、PrP は微小管に十分に近接しており、拡大画像からも PrP が黄色のドットとして観察された。このことから、HFIP は PrP の細胞内局在や微小管との結合に影響を及ぼさないことが示唆された (ScN2a; 図 11 A (a), 図 11 B (a), N2a; 図 11 A (b), 図 11 B (b))。

またミトコンドリアの正常な膜電位の維持は、ミトコンドリアのエネルギー産生機能が正常に機能し、細胞が健全な状態にあることを示す。蛍光色素 JC-1 はミトコンドリア外膜に電位依存的に集積し、正常な膜電位が維持されている時には凝集した赤色の

蛍光を発するが、膜電位が低下すると JC-1 は単量体の緑色の蛍光を発する。HFIP の処理が ScN2a 細胞のミトコンドリア膜電位に及ぼす影響を JC-1 染色を用いて検討したところ、HFIP が蛍光に及ぼす影響は観察されなかった (ScN2a; 図 11 A (a) (JC-1), N2a; 図 11 A (b) (JC-1))。以上の結果から、HFIP はミトコンドリアの膜電位に影響を及ぼさないか、影響は軽微であることが示唆された。

3-4. ScN2a 細胞は HFIP に対する感受性が高い

最後に HFIP の細胞毒性をクリスタルバイオレット染色によって評価した。N2a 細胞への HFIP の添加は、20 mM まで細胞生存率に影響を及ぼさなかった (図 12 A)。さらに非神経細胞として線維芽細胞である COS-7 細胞の生存率を同様の実験系で評価したところ、HFIP の添加は N2a 細胞と同様に、20 mM まで細胞生存率に影響を及ぼさなかった (図 12 B)。一方で ScN2a 細胞では、20 mM の HFIP により N2a 細胞と比較して 30%細胞生存率が低下した。40 mM の HFIP の添加では、ScN2a 細胞はほとんど生存しなかったのに対し、N2a 細胞は 40%の細胞が生存していた。以上の結果から、ScN2a 細胞は N2a 細胞と比較して HFIP に対する感受性が高いことが示唆された。

4. 考察

プリオン持続感染細胞株である ScN2a 細胞は、新規の抗プリオン活性を示す薬剤をスクリーニングするツールとして古くより用いられてきた。今日まで、ScN2a 細胞を用いて抗体や [146]、ドミナントネガティブ分子 [141, 147]、低分子化合物などの抗プリオン薬の評価がなされてきた。しかしながら多くの試みにかかわらず、プリオン病に対する治療薬として臨床的に功を奏した薬剤は未だ存在しない。

HFIP をはじめとしたフッ素系アルコールは、フッ素が水素でなく炭素に結合した特異な構造を持ちながらも、全体としてはアルコールとしての構造を持つ。またフッ素は電気陰性度が高く、基質分子の疎水性相互作用を不安定な状態に導き、分子内の水素結合を促進させる性質を有する。この性質から HFIP は β -シート構造を破壊し、 α -ヘリックス構造を誘導する活性を有すると考えられている。さらにこの活性を利用し、HFIP は凝集傾向の高い A β ペプチドの溶媒として用いられている [136, 137]。

先行研究において Wille らは、スクレイパーに感染したシリアンハムスターの脳抽出液を HFIP で処理することで、線維状の PrP のアミロイド構造が扁平ナリボン様の構造に変化することを報告した [148]。そこで本研究では組換えタンパク質を用いて作成した PrP 線維に対して HFIP を添加し、微細構造を透過型電子顕微鏡にて観察したところ、HFIP の添加は PrP の線維構造を規則構造を持たないアモルファス様の凝集体へと変化させることを見出した (図 9 A)。

これまでの研究において、HFIP のヘリックス構造誘導活性は高濃度の HFIP でのみ報告されてきた。例として A β の凝集のコア領域を含む A β (11-28) のペプチドを基質とした場合の CD スペクトルの測定では、90%の HFIP と 10%の水の混合液で α -ヘリックス誘導活性が見られ、水の含有量を 90%にまで増加させると β -シート含量が増加することが報告されている [135]。さらに低濃度の HFIP が A β 線維の形成を促進させることも報告されている [149, 150]。

本研究では 10 mM (0.17%) および 20 mM (0.34%) の HFIP を用いたため、A β (1-40) 線維の構造は変化せず、線維どうしの会合の促進が観察された (図 9 B)。この濃度で PrP および A β (1-40) 線維に対する HFIP の効果が異なるのは、それぞれの線維の構造が異なることに起因すると考えられる。A β (1-40) 線維は、分子の 90% がバックボーンとなるタイトなクロス β 構造を形成している [151, 152]。そのため HFIP は分子内に到達できず、線維の表面上にとどまることで、線維どうしの会合を促進させていると考えられる。一方で PrP は、非構造領域と 3 つの α -ヘリックス構造、2 つの短い β -シート構造から構成される [153, 154]。近年 Wang らはクライオ電子顕微鏡を用いた観察により、ヒトの全長の PrP^C (23-231 残基) の PrP 線維が左巻きのらせんに絡み合った 2 本のプロトフィブリルから構成されることを報告した [155]。これを踏まえると、PrP 線維はより変質しやすく、HFIP が分子内部に入り込み、線維状の構造から規則構造を持たないアモルファス様の構造へと変化させることが可能であると考えられる。

PrP^{Sc} は細胞膜上に集積しており、PrP^C から PrP^{Sc} への構造変換は主に細胞膜上の脂質ラフトか、細胞外で生じると考えられている [156]。HFIP が ScN2a の細胞内で PrP^{Sc} への構造変換を誘導し、プロテアーゼに対する感受性を変化させると考えると (図 10)、PrP は細胞内の分子シャペロンに認識され、タンパク質品質管理システムが作動する可能性がある。その結果、PrP の細胞内局在の変化が生じると考えられる [157]。しかしながら本研究では、PrP の細胞内局在は変化せず、細胞膜への輸送過程にある微小管上の局在を保っていた (図 11)。従って HFIP は細胞内には到達せず、PrP^{Sc} の構造変換によるプロテアーゼ抵抗性の減弱は細胞膜上で生じたと考えられる。さらにこれまで ScN2a 細胞を用いた実験系で抗プリオン活性を示した化合物は数日間の培養が必要であったことを踏まえると [158-160]、HFIP が 24 時間の処理で抗プリオン活性を示したことは注目に値するものと考えられる。また ScN2a 細胞において

PrP のプロテアーゼ抵抗性の減弱が観察された HFIP の濃度の範囲は、15-20 mM であった (図 10) 一方で、HFIP の細胞毒性は 20 mM 以降で有意に増加した (図 12)。したがって、ScN2a 細胞に対する HFIP の治療域は非常に狭いと考えられる。加えて、HFIP の α -ヘリックス誘導活性は非特異的であり、重大な副作用を引き起こす可能性が考えられる。以上を踏まえると HFIP そのもののプリオン病の治療薬としての効果を実証することは困難と考えられる。これらの問題を解決するためには、細胞毒性を示す濃度と α -ヘリックス誘導活性を発現する濃度が乖離した HFIP の誘導体を創出することが必要である。さらに HFIP の誘導体が PrP に対する高い基質特異性を有し、HFIP の α -ヘリックス誘導活性が非特異的に機能しないことも重要であると考えられる。

脂質ラフトは、コレステロールやスフィンゴ脂質に富んだ活性の高い細胞膜上のマイクロドメインであり、膜輸送やシグナル伝達、免疫反応の活性化などの細胞内の多様な現象に関与する重要な足場として機能する [161]。脂質ラフトの量と活性はコレステロールの利用率に大きく依存している [162, 163]。コレステロールの生合成はプリオンの感染により亢進することが報告されており [164]、コレステロール代謝とプリオン伝播の関連が示唆されている。コレステロールは同様に PrP の細胞膜上の発現と安定化に必須であり [165]、GPI アンカーを有する PrP^{Sc} は脂質ラフトに局在することから [166]、コレステロールの減少は PrP の脂質ラフトへの輸送を阻害することでプリオン複製を抑制することが報告されている [167, 168]。一般にアルコールは細胞膜からコレステロールを除去する活性を持ち、膜の流動性を高める性質を持つ。フッ素アルコールは脂質二重層の漏出やアシル鎖の秩序性の低下、脂質の相転移温度の変化 [169] やミセル凝集 [170] を引き起こすことが報告されている。さらに低濃度の HFIP (1-3 mM) は、電位依存性遅延整流型 K⁺チャネル Kv1.3 [171] やグラミシジンチャネル [169] などの膜タンパク質のイオン透過性に影響を及ぼすことが報告されて

いる。したがって本研究で見られた PrP^{Sc} のプロテアーゼ耐性の低下は、HFIP が膜脂質を不安定化させたことに起因している可能性もある。この問題を解決するためには、膜脂質に影響を及ぼさない、もしくは非特異的な作用を示さない HFIP の誘導体を開発する必要があると考えられる。

さらに ScN2a 細胞は HFIP に対する感受性が非常に高く、20 mM の HFIP の存在下で約 40% の細胞が死滅した。一方で N2a 細胞および COS-7 では、20 mM の HFIP の存在下でも有意な細胞生存率の低下が認められなかった (図 12)。細胞膜構成成分の違いはプリオン病の進行に影響を及ぼすことが知られており、小林らは脂質ラフトに豊富に存在するスフィンゴ糖脂質であるガングリオシドの合成を触媒する遺伝子を欠損させたマウスにおいて、プリオン感染に対する有意な生存期間の短縮を報告している [172]。さらに ScN2a 細胞ではコレステロールの代謝異常が生じることも報告されている [173]。以上を踏まえると HFIP の添加により ScN2a 細胞が N2a 細胞に比べて低い生存率を示した要因は細胞株間の細胞膜の構成成分の違いに起因している可能性がある。

一方で 20 mM の HFIP で生存した ScN2a 細胞のミトコンドリアの膜電位は PrP^{Sc} の存在下でも正常であった (図 11 A)。また PrP の細胞内局在も正常に保たれており、細胞が健全な状態であることが示唆された。ScN2a 細胞が N2a 細胞に比べて HFIP に対して高い感受性を示すことを考慮すると、以上の結果は ScN2a 細胞を HFIP で処理することで HFIP への感受性が高い細胞集団が排除され、健全な細胞のみが得られることも示唆している。さらに HFIP (分子量: 168.04) のような低分子は、一般的に分子量 400 以下の物質を通過させることができる血液脳関門を容易に通過することができるため [174]、薬物動態を鑑みても神経変性疾患の治療薬としての有用性が高いと考えられる。

プリオン病治療薬の開発に関するこれまでの研究で行われてきた培養細胞を用いた実験系での検討は、生体の環境に比べて非常に簡略されたモデルを用いた検討である。したがってHFIPをはじめとしたフッ素化合物のプリオン病治療薬への実用化には、培養細胞を用いた実験系に加えた動物実験を用いた検討が不可欠であると考えられる。

5. 小括

本章ではプリオン病の新規治療薬の開発に向けて強い α -ヘリックス誘導活性を持つ HFIP に着目し、組換えタンパク質および PrP^{Sc} を持続産生する ScN2a 細胞を用いて HFIP のプリオン病治療薬としての基礎的検討を実施した。組換えタンパク質を用いて PrP 線維を作成し、HFIP の添加が線維構造に及ぼす影響を透過型電子顕微鏡にて観察したところ、10 mM の HFIP の添加により線維構造は分岐した三叉の構造に変化した。さらに 20 mM の HFIP の添加は線維構造を完全に消失させ、規則構造を持たないアモルファス様の凝集体を形成させた。一方で A β (1-40) 線維への HFIP の添加は線維構造を変化させないものの、濃度依存的に線維どうしの凝集を促進させた。また、HFIP の添加が二次構造に及ぼす影響を CD スペクトル測定にて観察したところ、HFIP は A β (1-40) と比較して PrP に対して強い α -ヘリックス誘導活性を持つことが明らかとなった。さらに ScN2a 細胞に HFIP を添加し、PrP のプロテアーゼ感受性をウェスタンブロットによって検出したところ、15 mM 以上の HFIP の添加は PrP のプロテアーゼ抵抗性を有意に減弱させた。このとき、HFIP は PrP の細胞内局在およびミトコンドリアの膜電位に影響を及ぼさなかった。最後に、HFIP の細胞毒性をクリスタルバイオレット染色によって測定したところ、ScN2a 細胞は N2a 細胞と比較して有意に低い細胞生存率を示した。以上の結果から、HFIP の PrP に対する強いヘリックス誘導活性と PrP^{Sc} を持った細胞への特異的な細胞毒性を確認することができた。治療域の狭さや、PrP に対する特異性の問題など治療薬としての実用化に向けての課題はあるものの、PrP^{Sc} から PrP^C への誘導を目的とした HFIP のプリオン病治療薬としての作用機序はこれまでに開発が進められてきた治療薬にはない新規のアプローチであり、HFIP を含めたフッ素化合物がプリオン病治療薬となり得る可能性が示唆された。

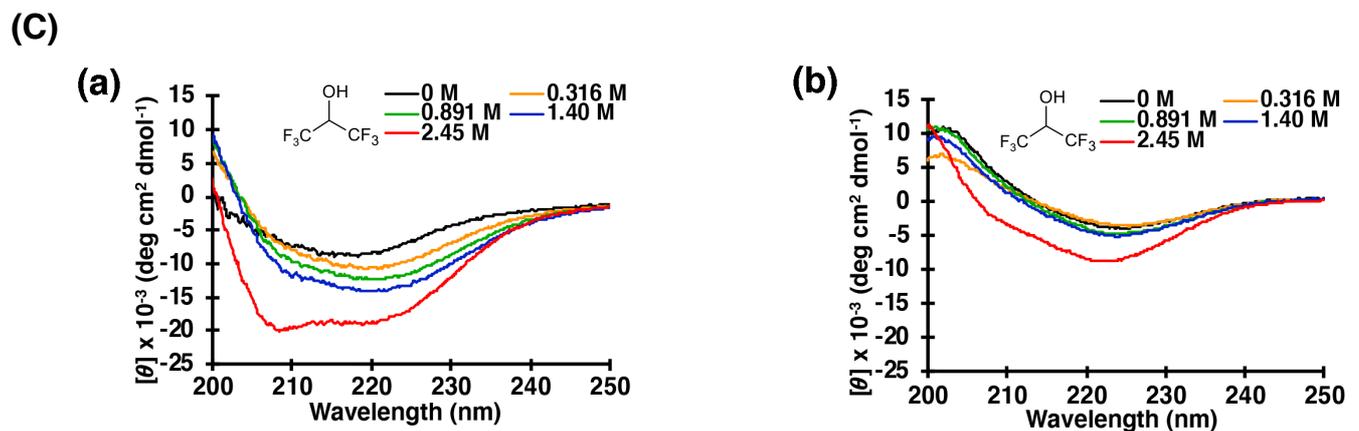
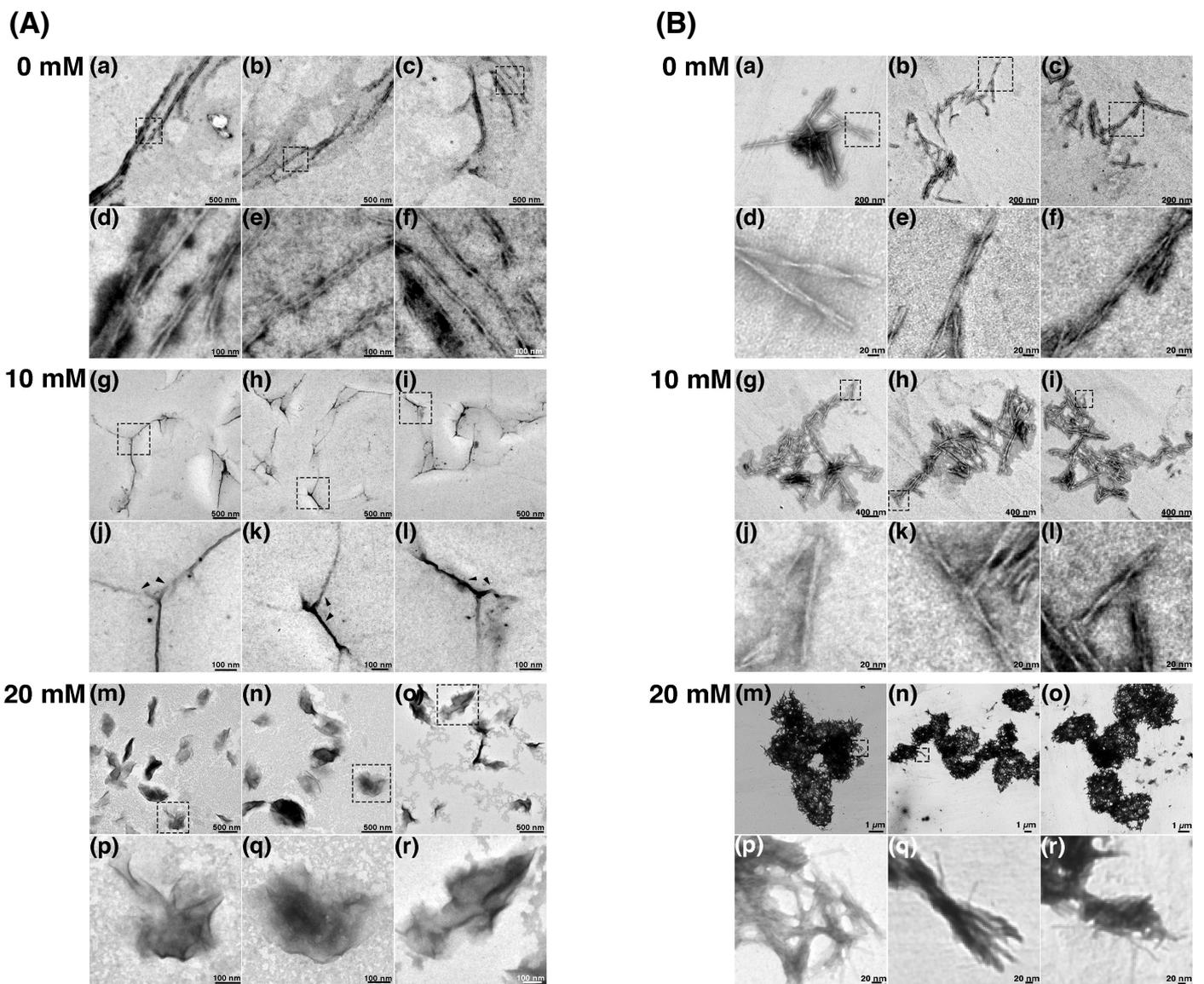


図9: HFIPはPrPおよびAβ線維に異なる影響を及ぼす

(A) PrP線維をHFIPとインキュベートし、微細構造を透過型電子顕微鏡で観察した。HFIPの非存在下では、PrP線維は分岐のない直線構造を呈した (a)-(c), 拡大図 (d)-(f)。10 mMのHFIPを添加し、37°Cで24時間インキュベートしたとき、PrP線維は三叉に分岐した構造を呈した (g)-(l), 拡大図 (i)-(l)。20 mMのHFIPを添加したとき、PrP線維は構造を持たないアモルファス様の凝集体を呈した (m)-(o), 拡大図 (p)-(r)。 (B) Aβ (1-40) のアミロイド線維をHFIPとインキュベートし、微細構造を透過型電子顕微鏡で観察した。Aβ (1-40) の線維構造は10 mMおよび20 mMのHFIP添加により変化しなかった。一方でHFIPの濃度依存的に線維同士の凝集が促進された (a)-(c), (g)-(l), (m)-(o), 拡大図 (d)-(f), (j)-(l), (p)-(r)。スケールバーはそれぞれのパネルに示した。 (C) CD測定により、HFIPを添加したPrPおよび Aβ (1-40) アミロイド線維の二次構造を推定した。HFIPの添加はPrP線維の二次構造の変化を誘導した (a)。Aβ (1-40) アミロイド線維はHFIPに耐性を持ち、二次構造の変化は限定的であった。

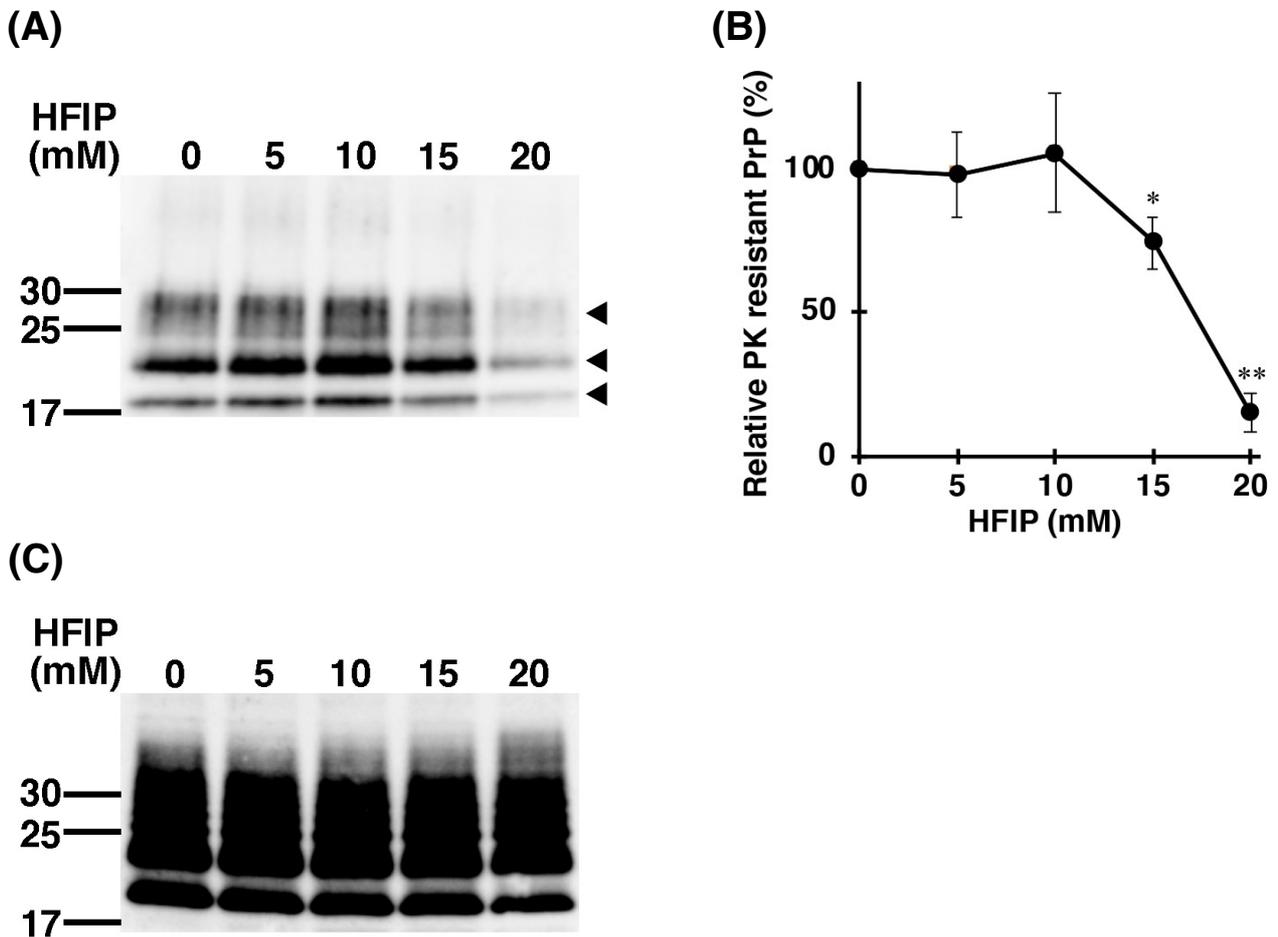


図10: HFIPはScN2a細胞におけるPrPのプロテアーゼ抵抗性を減弱させる

(A) 0, 5, 10, 15, 20 mMのHFIPをScN2a細胞の培地に添加し24時間培養した後、PrPのPK感受性を検出した。ウェスタンブロットを用いてPK耐性を持つPrPのバンドを検出した(矢頭は無糖鎖、1糖鎖、2糖鎖修飾を受けたPrPを示す)。(B) (A)における定量値。HFIPの濃度依存的にPrPのPK抵抗性が減弱した。統計学的有意差はHFIP 0 mMに対して $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ で示した。n=4。エラーバーは標準偏差を示す。(C) PK処理前のPrPのバンド。

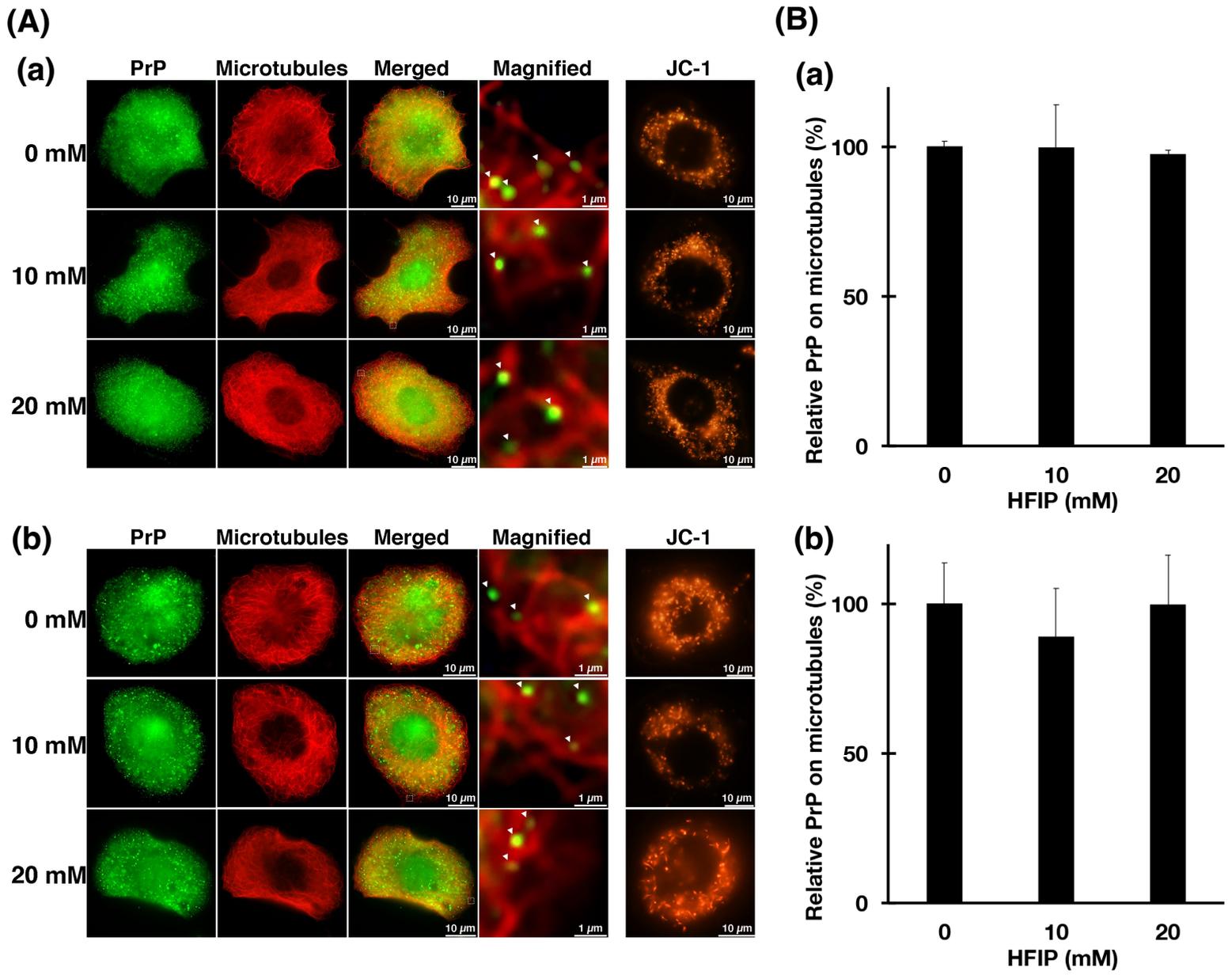


図11: HFIPはPrPの細胞内局在およびミトコンドリアの膜電位に影響を及ぼさない

(A) HFIPを添加したScN2a細胞 (a) およびN2a細胞 (b) における内在性のPrPの細胞内局在を抗PrP抗体および抗 α -Tubulin抗体を用いた免疫染色にて検出した。矢頭は微小管 (赤) 上に局在したPrP (緑) を示す。また、JC-1染色によりHFIPの添加がミトコンドリア膜電位に及ぼす影響を観察した。(B) 微小管上に局在したPrPの定量値。HFIP未添加群の細胞において微小管上に局在したPrPの数を100%として示した。微小管上のPrPの局在およびミトコンドリアの膜電位はHFIPの添加で変化しなかった。n=3。エラーバーは標準偏差を示す。

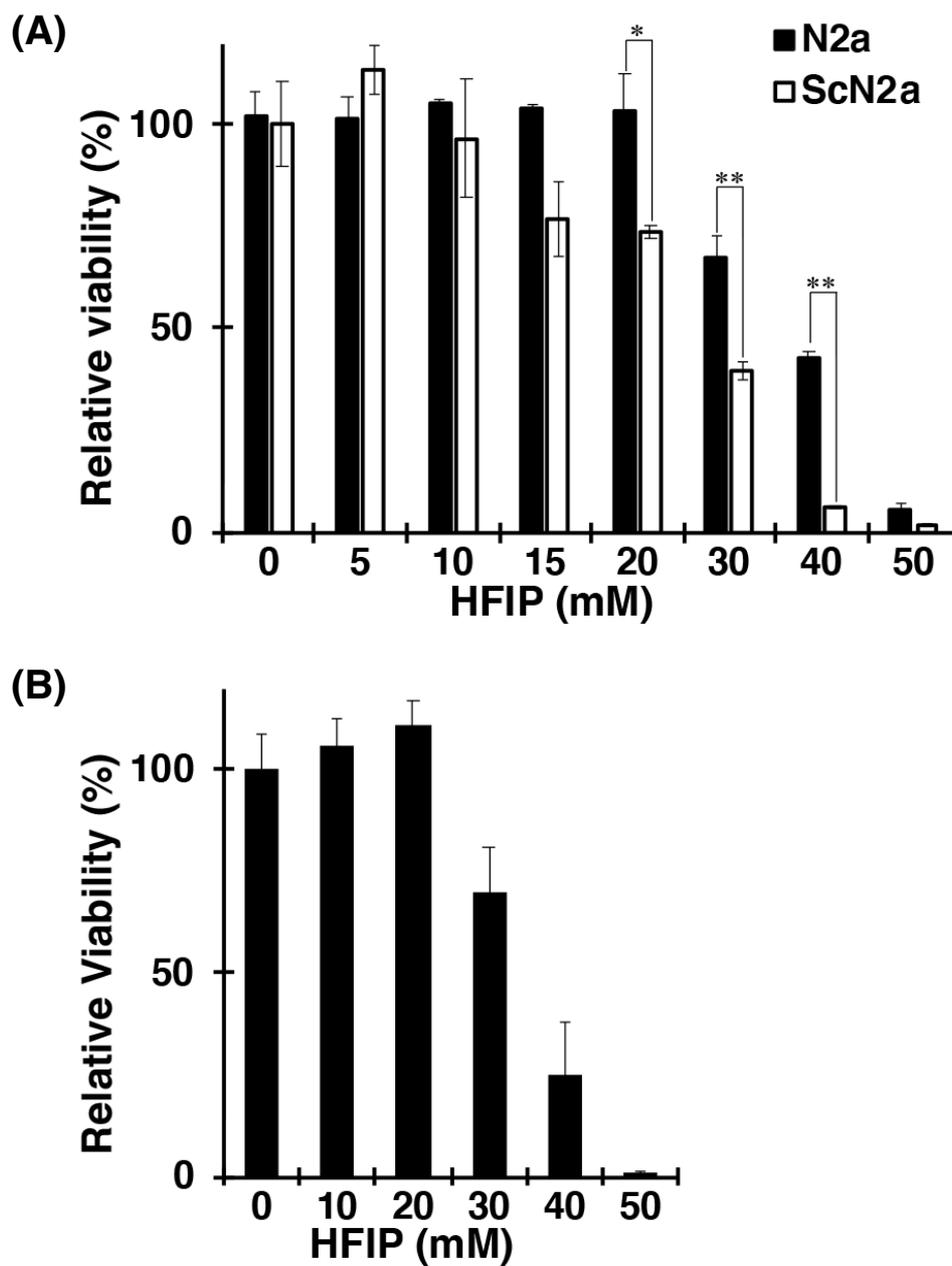


図12: HFIPはScN2a細胞に高い感受性を示す

(A) ScN2a細胞、N2a細胞にHFIPを添加し、24時間インキュベートした時の細胞生存率をクリスタルバイオレット染色によって評価した。20, 30, 40 mMのHFIPの添加で、ScN2a細胞はN2a細胞と比較して有為に低い細胞生存率を示した。エラーバーは標準偏差を示す。n=3。統計学的有意差はN2a細胞に対して、* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ で示した。(B) COS-7細胞にHFIPを添加し、24時間インキュベートした時の細胞生存率を評価した。n=3。

<総括>

プリオン病の神経変性機構は明らかとされておらず、今日において有効な治療法が存在しない致死性疾患である。そこで本博士論文ではプリオン病の神経変性機構の解明および新規治療薬の開発に向けた基礎的研究を実施した。

第一章では分泌系のタンパク質である PrP のミトコンドリアへの異所性の局在が神経変性の原因となり得ることが報告されていることを踏まえ、PrP のミトコンドリアへの標的化機構および PrP のミトコンドリアへの異所性の局在が細胞機能に及ぼす影響を解析した。タンパク質のミトコンドリアへの異所性の局在には、固有のミトコンドリア局在配列が必須であることから、様々な長さのトランケート PrP の局在を観察したところ、PrP のアミノ酸配列上の 122 番目から 139 番目までのアミノ酸がミトコンドリアへの局在配列として機能することを明らかとした。さらに、神経細胞特異的にミトコンドリア外膜に局在した PrP は正常なミトコンドリアの細胞内分布を破綻させ、ミトコンドリアを高度に核の周囲に集積させることを見出した。また、RNA 干渉を用いた実験系より PrP のミトコンドリアへの標的化には細胞質側の因子として 14-3-3 γ および η 、ミトコンドリア外膜上の受容体として Tom70 が特異的に機能すること、14-3-3 ζ は神経細胞においてミトコンドリアの正常な細胞内分布の破綻に関与していることを明らかとした。軸索はシグナル伝達等で多量の ATP を要求し、これを可能とするためミトコンドリアは微小管上を核方向および細胞膜方向に移動する。神経細胞におけるミトコンドリアの核周囲への集積は軸索におけるエネルギー供給不全を惹起し、続発する軸索の退縮はプリオン病の神経変性の一端を担うものと考えられた。

第二章では、プリオン病の発症が α -ヘリックス構造に富んだ PrP^Cの β -シート構造に富んだ PrP^{Sc}への高次構造変換によって惹起されることから、強い α -ヘリックス誘導活性をもつ HFIP に着目し、組換えタンパク質および PrP^{Sc}を持続産生しプリオン病の *in vitro* のモデルとして採用されている ScN2a 細胞を用い、HFIP のプリオン病治療薬へ

の応用に向けた基礎的研究を行った。組換えタンパク質を用いて PrP 線維および A β (1-40) 線維を作成し、HFIP がそれぞれの線維構造に及ぼす影響を透過型電子顕微鏡にて観察したところ、20 mM の HFIP の添加は PrP 線維の線維構造を消失させたのに対し、A β (1-40) 線維の会合を促進させた。さらに CD スペクトル測定の結果から、PrP 線維は A β (1-40) 線維と比較して低濃度で α -ヘリックス構造が誘導されることが明らかとなった。また、ScN2a 細胞を用いたプロテアーゼ感受性試験の結果より、ScN2a 細胞への HFIP の添加が PrP^{Sc} の生化学的特徴であるプロテアーゼに対する抵抗性を減弱させることが明らかとなった。この時の PrP の細胞内局在およびミトコンドリアの膜電位は正常であったことから、HFIP は PrP の細胞内輸送およびミトコンドリアにおける ATP の産生に影響を及ぼさないと考えられた。さらに ScN2a 細胞への HFIP の添加は N2a 細胞に比べて低い細胞生存率を示した。以上から、HFIP の PrP に対する強いヘリックス誘導活性と、PrP^{Sc} を有した細胞への高い感受性が示唆された。

第一章において PrP (1-139) がミトコンドリア局在配列をもとにミトコンドリアに局在し、PrP のミトコンドリアへの局在がプリオン病の病因となり得ることを明らかとしたものの、実際にミトコンドリアに局在した PrP (1-139) が線維構造を呈するのかについては明らかでない。さらに第二章ではプリオン病治療薬のスクリーニングに広く用いられる PrP (23-231) の組換えタンパク質より作成した PrP 線維、および ScN2a 細胞を用いた検討を行ったことから、PrP のミトコンドリアへの異所性の局在による神経変性に対して HFIP が抑制効果を持つか否かは本研究から判断することができない。PrP がミトコンドリアに局在することが知られ、遺伝性プリオン病を引き起こす PrP の 145 番目のチロシンのストップコドンへの変異を反映した PrP (23-144) の組換えタンパク質が生理的条件下でアミロイド線維を形成すること [175] や、138 番目と 139 番目のアミノ酸がアミロイド線維の形成に重要な役割を示すことが報告されていることから [176]、PrP (1-139) も β -シートに富んだ構造をとることが予想されるが、PrP のミト

コンドリアへの異所性の局在に対する HFIP による治療効果を実証するためには PrP (1-139) の組換えタンパク質を基質とした実験が必要である。また、PrP^C から PrP^{Sc} への高次構造変換は細胞膜上で起こると考えられているが [154]、プリオン病の神経変性は第一章で明らかとなった PrP のミトコンドリアへの異所性の局在や、先行研究においては PrP の細胞質 [177] や核への異所性の局在 [178] が関与することも報告されている。第二章で観察された HFIP の ScN2a 細胞における PrP^{Sc} に対する α -ヘリックス誘導活性は細胞膜上で発現すると考えられることから、様々な要因が発症要因として示唆されているプリオン病において治療薬としての効果を十分に発揮するには、HFIP をはじめとしたフッ素化合物の細胞内への送達技術も必要であると考えられる。

本研究はプリオン病の神経変性機構の解明および治療開発に向けた基礎的研究として培養細胞と組換えタンパク質を用いた実験系での検討を行った。複雑な生体環境において、本研究で明らかとなったプリオン病の神経変性機構およびプリオン病治療効果を実証するためには、動物実験を用いた更なる検討が不可欠である。

<謝辞>

本研究を遂行するにあたり、多くの方々からご指導とご協力を賜りました。

セントラル硝子株式会社 New-STEP 研究所 湘南リサーチセンター の八谷如美先生には本研究の立案から論文の執筆まで終始懇切なるご指導を賜りました。最後に直接感謝の気持ちをお伝えすることができなかつたことが心残りではございますが、先生のご冥福を心よりお祈りいたします。ゆっくりお休みください。

透過型電子顕微鏡観察には、地方独立行政法人 東京都立産業技術研究センター 森河和雄副主任研究員、株式会社 真空デバイス 小塚芳道先生、円偏光二色性スペクトルの測定には、鳥取大学工学部 化学バイオ系学科 生物機能開発工学研究室 八木寿梓准教授、伊藤佑夏氏にご協力いただきました。本研究全体を通じて本学獣医学研究科 生化学研究室 山下匡教授、永根大幹講師、公益財団法人 東京都医学総合研究所 脳・神経科学研究分野 認知症プロジェクト 亀谷富由樹研究員、セントラル硝子株式会社 小川毅氏にはたくさんの有益なご助言をいただきました。また本学獣医学研究科病理学研究室 上家潤一教授、解剖学第二研究室 坂上元栄教授には学位審査の副査をお引き受けいただきました。皆様に心より御礼申し上げます。

最後になりますが、博士課程の学生生活を通じて常に励まし、応援し続けてくれた家族に心より感謝いたします。ありがとうございました。

<参考文献>

1. Prusiner SB (1998) Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13363-13383
2. Manix M, Kalakoti P, Henry M, Thakur J, Menger R, Guthikonda B, Nanda A (2015) Creutzfeldt-Jakob disease: updated diagnostic criteria, treatment algorithm, and the utility of brain biopsy. *Neurosurg Focus* 39:E2
3. Geschwind MD (2015) Prion Diseases. *Continuum (Minneap Minn)* 21:1612-1638
4. Jones E, Hummerich H, Viré E, Uphill J, Dimitriadis A, Speedy H, Campbell T, Norsworthy P, Quinn L, Whitfield J, Linehan J, Jaunmuktane Z, Brandner S, Jat P, Nihat A, How Mok T, Ahmed P, Collins S, Stehmann C, Sarros S, Kovacs GG, Geschwind MD, Golubjatnikov A, Frontzek K, Budka H, Aguzzi A, Karamujić-Čomić H, van der Lee SJ, Ibrahim-Verbaas CA, van Duijn CM, Sikorska B, Golanska E, Liberski PP, Calero M, Calero O, Sanchez-Juan P, Salas A, Martínón-Torres F, Bouaziz-Amar E, Haïk S, Laplanche JL, Brandel JP, Amouyel P, Lambert JC, Parchi P, Bartoletti-Stella A, Capellari S, Pologgi A, Ladogana A, Pocchiari M, Aneli S, Matullo G, Knight R, Zafar S, Zerr I, Booth S, Coulthart MB, Jansen GH, Glisic K, Blevins J, Gambetti P, Safar J, Appleby B, Collinge J, Mead S (2020) Identification of novel risk loci and causal insights for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: a genome-wide association study. *Lancet Neurol* 19:840-848
5. Appleby BS, Shetty S, Elkasaby M (2022) Genetic aspects of human prion diseases. *Front Neurol* 13:1003056
6. Pocchiari M, Puopolo M, Croes EA, Budka H, Gelpi E, Collins S, Lewis V, Sutcliffe T, Guilivi A, Delasnerie-Laupretre N, Brandel JP, Alperovitch A,

- Zerr I, Poser S, Kretzschmar HA, Ladogana A, Rietvald I, Mitrova E, Martinez-Martin P, de Pedro-Cuesta J, Glatzel M, Aguzzi A, Cooper S, Mackenzie J, van Duijn CM, Will RG (2004) Predictors of survival in sporadic Creutzfeldt–Jakob disease and other human transmissible spongiform encephalopathies. *Brain* 127:2348-2359
7. Mead S, Burnell M, Lowe J, Thompson A, Lukic A, Porter MC, Carswell C, Kaski D, Kenny J, Mok TH, Bjurstrom N, Franko E, Gorham M, Druyeh R, Wadsworth JD, Jaunmuktane Z, Brandner S, Hyare H, Rudge P, Walker AS, Collinge J (2016) Clinical Trial Simulations Based on Genetic Stratification and the Natural History of a Functional Outcome Measure in Creutzfeldt-Jakob Disease. *JAMA Neurol* 73:447-455
 8. Llorens F, Rübsamen N, Hermann P, Schmitz M, Villar-Piqué A, Goebel S, Karch A, Zerr I (2020) A prognostic model for overall survival in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Alzheimers Dement* 16:1438-1447
 9. Shibuya S, Higuchi J, Shin RW, Tateishi J, Kitamoto T (1998) Codon 219 Lys allele of PRNP is not found in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 43:826-828
 10. Kovács GG, Puopolo M, Ladogana A, Pocchiari M, Budka H, van Duijn C, Collins SJ, Boyd A, Giulivi A, Coulthart M, Delasnerie-Laupretre N, Brandel JP, Zerr I, Kretzschmar HA, de Pedro-Cuesta J, Calero-Lara M, Glatzel M, Aguzzi A, Bishop M, Knight R, Belay G, Will R, Mitrova E (2005) Genetic prion disease: the EUROCCJD experience. *Hum Genet* 118:166-174
 11. Goldfarb LG, Brown P, McCombie WR, Goldgaber D, Swergold GD, Wills PR, Cervenakova L, Baron H, Gibbs CJ, Jr., Gajdusek DC (1991)

- Transmissible familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with five, seven, and eight extra octapeptide coding repeats in the PRNP gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10926-10930
12. Jansen C, Parchi P, Capellari S, Vermeij AJ, Corrado P, Baas F, Strammiello R, van Gool WA, van Swieten JC, Rozemuller AJ (2010) Prion protein amyloidosis with divergent phenotype associated with two novel nonsense mutations in PRNP. *Acta Neuropathol* 119:189-197
 13. Windl O, Giese A, Schulz-Schaeffer W, Zerr I, Skworc K, Arendt S, Oberdieck C, Bodemer M, Poser S, Kretzschmar HA (1999) Molecular genetics of human prion diseases in Germany. *Hum Genet* 105:244-252
 14. Collinge J (2001) Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci* 24:519-550
 15. Knight R (2017) Infectious and Sporadic Prion Diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci* 150:293-318
 16. Budka H, Will RG (2015) The end of the BSE saga: do we still need surveillance for human prion diseases? *Swiss Med Wkly* 145:w14212
 17. Bonda DJ, Manjila S, Mehndiratta P, Khan F, Miller BR, Onwuzulike K, Puoti G, Cohen ML, Schonberger LB, Cali I (2016) Human prion diseases: surgical lessons learned from iatrogenic prion transmission. *Neurosurg Focus* 41:E10
 18. Will RG, Ironside J, Zeidler M, Estibeiro K, Cousens S, Smith P, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A (1996) A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *The Lancet* 347:921-925
 19. Shinde A, Kunieda T, Kinoshita Y, Wate R, Nakano S, Ito H, Yamada M,

- Kitamoto T, Nakamura Y, Matsumoto S, Kusaka H (2009) The first Japanese patient with variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD). *Neuropathology* 29:713-719
20. Yamanouchi K, Yoshikawa Y (2007) Bovine spongiform encephalopathy (BSE) safety measures in Japan. *J Vet Med Sci* 69:1-6
 21. Schätzl HM, Da Costa M, Taylor L, Cohen FE, Prusiner SB (1997) Prion protein gene variation among primates. *J Mol Biol* 265:257
 22. Bendheim PE, Brown HR, Rudelli RD, Scala LJ, Goller NL, Wen GY, Kascsak RJ, Cashman NR, Bolton DC (1992) Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology* 42:149-156
 23. Prusiner SB (1991) Molecular biology of prion diseases. *Science* 252:1515-1522
 24. Hackl S, Becker CFW (2019) Prion protein-Semisynthetic prion protein (PrP) variants with posttranslational modifications. *J Pept Sci* 25:e3216
 25. Zahn R, Liu A, Lührs T, Riek R, von Schroetter C, López García F, Billeter M, Calzolari L, Wider G, Wüthrich K (2000) NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:145-150
 26. Lawson VA, Collins SJ, Masters CL, Hill AF (2005) Prion protein glycosylation. *Journal of Neurochemistry* 93:793-801
 27. Naslavsky N, Stein R, Yanai A, Friedlander G, Taraboulos A (1997) Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *J Biol Chem* 272:6324-6331
 28. Parizek P, Roeckl C, Weber J, Flechsig E, Aguzzi A, Raeber AJ (2001) Similar turnover and shedding of the cellular prion protein in primary lymphoid

- and neuronal cells. *J Biol Chem* 276:44627-44632
29. Linden R (2017) The Biological Function of the Prion Protein: A Cell Surface Scaffold of Signaling Modules. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10
 30. Brown DR, Schulz-Schaeffer WJ, Schmidt B, Kretzschmar HA (1997) Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol* 146:104-112
 31. Roguski A, Gill AC (2017) The Role of the Mammalian Prion Protein in the Control of Sleep. *Pathogens* 6
 32. Caughey B, Raymond GJ (1993) Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells. *J Virol* 67:643-650
 33. Caughey B, Race RE (1992) Potent inhibition of scrapie-associated PrP accumulation by congo red. *J Neurochem* 59:768-771
 34. Miyazaki Y, Ishikawa T, Kamatari YO, Nakagaki T, Takatsuki H, Ishibashi D, Kuwata K, Nishida N, Atarashi R (2019) Identification of Alprenolol Hydrochloride as an Anti-prion Compound Using Surface Plasmon Resonance Imaging. *Mol Neurobiol* 56:367-377
 35. Krance SH, Luke R, Shenouda M, Israwi AR, Colpitts SJ, Darwish L, Strauss M, Watts JC (2020) Cellular models for discovering prion disease therapeutics: Progress and challenges. *Journal of Neurochemistry* 153:150-172
 36. Shimizu T, Kozuka Y, Kusano M, Nagane M, Yamashita T, Hachiya N (2020) PrP (122-139) is a covert mitochondrial targeting signal of prion protein and it specifically triggers the perinuclear clustering of mitochondria in neuronal culture cells. *Biochem Biophys Res Commun* 524:301-307

37. Shimizu T, Nogami E, Ito Y, Morikawa K, Nagane M, Yamashita T, Ogawa T, Kametani F, Yagi H, Hachiya N (2021) Volatile Anesthetic Sevoflurane Precursor 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-Propanol (HFIP) Exerts an Anti-Prion Activity in Prion-Infected Culture Cells. *Neurochem Res* 46:2056-2065
38. John P, Whatley FR (1975) *Paracoccus denitrificans* and the evolutionary origin of the mitochondrion. *Nature* 254:495-498
39. Keenan RJ, Freymann DM, Stroud RM, Walter P (2001) The signal recognition particle. *Annu Rev Biochem* 70:755-775
40. Cavalier-Smith T (2000) Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci* 5:174-182
41. Nyathi Y, Wilkinson BM, Pool MR (2013) Co-translational targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833:2392-2402
42. Hung MC, Link W (2011) Protein localization in disease and therapy. *J Cell Sci* 124:3381-3392
43. Walls KC, Coskun P, Gallegos-Perez JL, Zadourian N, Freude K, Rasool S, Blurton-Jones M, Green KN, LaFerla FM (2012) Swedish Alzheimer mutation induces mitochondrial dysfunction mediated by HSP60 mislocalization of amyloid precursor protein (APP) and beta-amyloid. *J Biol Chem* 287:30317-30327
44. Wang W, Wang L, Lu J, Siedlak SL, Fujioka H, Liang J, Jiang S, Ma X, Jiang Z, da Rocha EL, Sheng M, Choi H, Lerou PH, Li H, Wang X (2016) The inhibition of TDP-43 mitochondrial localization blocks its neuronal toxicity. *Nat Med* 22:869-878

45. Shavali S, Brown-Borg HM, Ebadi M, Porter J (2008) Mitochondrial localization of alpha-synuclein protein in alpha-synuclein overexpressing cells. *Neurosci Lett* 439:125-128
46. Stahl N, Prusiner SB (1991) Prions and prion proteins. *Faseb j* 5:2799-2807
47. Wulf MA, Senatore A, Aguzzi A (2017) The biological function of the cellular prion protein: an update. *BMC Biol* 15:34
48. Westaway D, DeArmond SJ, Cayetano-Canlas J, Groth D, Foster D, Yang SL, Torchia M, Carlson GA, Prusiner SB (1994) Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins. *Cell* 76:117-129
49. Hachiya NS, Yamada M, Watanabe K, Jozuka A, Ohkubo T, Sano K, Takeuchi Y, Kozuka Y, Sakasegawa Y, Kaneko K (2005) Mitochondrial localization of cellular prion protein (PrPC) invokes neuronal apoptosis in aged transgenic mice overexpressing PrPC. *Neurosci Lett* 374:98-103
50. Hachiya NS, Watanabe K, Kawabata MY, Jozuka A, Kozuka Y, Sakasegawa Y, Kaneko K (2005) Prion protein with Y145STOP mutation induces mitochondria-mediated apoptosis and PrP-containing deposits in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 327:894-899
51. Faris R, Moore RA, Ward A, Race B, Dorward DW, Hollister JR, Fischer ER, Priola SA (2017) Cellular prion protein is present in mitochondria of healthy mice. *Sci Rep* 7:41556
52. Hachiya NS, Watanabe K, Yamada M, Sakasegawa Y, Kaneko K (2004) Anterograde and retrograde intracellular trafficking of fluorescent cellular prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 315:802-807

53. Pignatelli M, Cortés-Canteli M, Santos A, Perez-Castillo A (1999) Involvement of the NGFI-A gene in the differentiation of neuroblastoma cells. *FEBS Letters* 461:37-42
54. Hachiya NS, Watanabe K, Sakasegawa Y, Kaneko K (2004) Microtubules-associated intracellular localization of the NH₂-terminal cellular prion protein fragment. *Biochem Biophys Res Commun* 313:818-823
55. Quintana-Cabrera R, Mehrotra A, Rigoni G, Soriano ME (2018) Who and how in the regulation of mitochondrial cristae shape and function. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 500:94-101
56. Mihara K, Omura T (1996) Cytosolic factors in mitochondrial protein import. *Experientia* 52:1063-1068
57. Hsich G, Kenney K, Gibbs CJ, Lee KH, Harrington MG (1996) The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *N Engl J Med* 335:924-930
58. Komiya T, Hachiya N, Sakaguchi M, Omura T, Mihara K (1994) Recognition of mitochondria-targeting signals by a cytosolic import stimulation factor, MSF. *J Biol Chem* 269:30893-30897
59. Komiya T, Sakaguchi M, Mihara K (1996) Cytoplasmic chaperones determine the targeting pathway of precursor proteins to mitochondria. *Embo j* 15:399-407
60. Alam R, Hachiya N, Sakaguchi M, Kawabata S, Iwanaga S, Kitajima M, Mihara K, Omura T (1994) cDNA cloning and characterization of mitochondrial import stimulation factor (MSF) purified from rat liver cytosol. *J Biochem* 116:416-425

61. Araiso Y, Endo T (2022) Structural overview of the translocase of the mitochondrial outer membrane complex. *Biophys Physicobiol* 19:e190022
62. Rapaport D (2002) Biogenesis of the mitochondrial TOM complex. *Trends Biochem Sci* 27:191-197
63. Dietmeier K, Hönlinger A, Bömer U, Dekker PJ, Eckerskorn C, Lottspeich F, Kübrich M, Pfanner N (1997) Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore. *Nature* 388:195-200
64. Dembowski M, Kunkele KP, Nargang FE, Neupert W, Rapaport D (2001) Assembly of Tom6 and Tom7 into the TOM core complex of *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* 276:17679-17685
65. Rapoport TA, Li L, Park E (2017) Structural and Mechanistic Insights into Protein Translocation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 33:369-390
66. Wiedemann N, Pfanner N (2017) Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly. *Annu Rev Biochem* 86:685-714
67. Zhu T, Chen JL, Wang Q, Shao W, Qi B (2018) Modulation of Mitochondrial Dynamics in Neurodegenerative Diseases: An Insight Into Prion Diseases. *Front Aging Neurosci* 10:336
68. Omura T (1998) Mitochondria-targeting sequence, a multi-role sorting sequence recognized at all steps of protein import into mitochondria. *J Biochem* 123:1010-1016
69. Gaston D, Tsaousis AD, Roger AJ (2009) Predicting proteomes of mitochondria and related organelles from genomic and expressed sequence tag data. *Methods Enzymol* 457:21-47
70. Pfeiffer NV, Dirndorfer D, Lang S, Resenberger UK, Restelli LM, Hemion C,

- Miesbauer M, Frank S, Neutzner A, Zimmermann R, Winklhofer KF, Tatzelt J (2013) Structural features within the nascent chain regulate alternative targeting of secretory proteins to mitochondria. *Embo j* 32:1036-1051
71. Aviram N, Schuldiner M (2017) Targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum at a glance. *J Cell Sci* 130:4079-4085
72. Hirata T, Yang J, Tomida S, Tokoro Y, Kinoshita T, Fujita M, Kizuka Y (2022) ER entry pathway and glycosylation of GPI-anchored proteins are determined by N-terminal signal sequence and C-terminal GPI-attachment sequence. *J Biol Chem* 298:102444
73. Fernandez-Fernandez S, Almeida A, Bolaños JP (2012) Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes. *Biochem J* 443:3-11
74. McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S (2006) Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol* 16:R551-560
75. Devine MJ, Kittler JT (2018) Mitochondria at the neuronal presynapse in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 19:63-80
76. Melkov A, Abdu U (2018) Regulation of long-distance transport of mitochondria along microtubules. *Cell Mol Life Sci* 75:163-176
77. Hollenbeck PJ, Saxton WM (2005) The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci* 118:5411-5419
78. Schwarz TL (2013) Mitochondrial trafficking in neurons. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5
79. Lin MY, Sheng ZH (2015) Regulation of mitochondrial transport in neurons. *Exp Cell Res* 334:35-44

80. Wiedemann N, Frazier AE, Pfanner N (2004) The protein import machinery of mitochondria. *J Biol Chem* 279:14473-14476
81. Harbauer AB, Zahedi RP, Sickmann A, Pfanner N, Meisinger C (2014) The protein import machinery of mitochondria-a regulatory hub in metabolism, stress, and disease. *Cell Metab* 19:357-372
82. Murcha MW, Kmiec B, Kubiszewski-Jakubiak S, Teixeira PF, Glaser E, Whelan J (2014) Protein import into plant mitochondria: signals, machinery, processing, and regulation. *J Exp Bot* 65:6301-6335
83. Pfanner N, Warscheid B, Wiedemann N (2019) Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20:267-284
84. Ikon N, Ryan RO (2017) Cardiolipin and mitochondrial cristae organization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1859:1156-1163
85. Gilkerson RW, Selker JM, Capaldi RA (2003) The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett* 546:355-358
86. Vogel F, Bornhövd C, Neupert W, Reichert AS (2006) Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol* 175:237-247
87. Bonetto V, Massignan T, Chiesa R, Morbin M, Mazzoleni G, Diomedede L, Angeretti N, Colombo L, Forloni G, Tagliavini F, Salmona M (2002) Synthetic Miniprion PrP106*. *Journal of Biological Chemistry* 277:31327-31334
88. Wu W, Zhao D, Shah SZA, Zhang X, Lai M, Yang D, Wu X, Guan Z, Li J, Zhao H, Li W, Gao H, Zhou X, Qiao J, Yang L (2019) OPA1 overexpression

- ameliorates mitochondrial cristae remodeling, mitochondrial dysfunction, and neuronal apoptosis in prion diseases. *Cell Death & Disease* 10:710
89. Liu HM, Loo YM, Horner SM, Zornetzer GA, Katze MG, Gale M, Jr. (2012) The mitochondrial targeting chaperone 14-3-3 ϵ regulates a RIG-I translocon that mediates membrane association and innate antiviral immunity. *Cell Host Microbe* 11:528-537
 90. Satoh J, Onoue H, Arima K, Yamamura T (2005) The 14-3-3 protein forms a molecular complex with heat shock protein Hsp60 and cellular prion protein. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:858-868
 91. Han J, Song QQ, Sun P, Zhang J, Wang X, Song J, Li GQ, Liu YH, Mei GY, Shi Q, Tian C, Chen C, Gao C, Zhao B, Dong XP (2014) Interaction between 14-3-3 β and PrP influences the dimerization of 14-3-3 and fibrillization of PrP106-126. *Int J Biochem Cell Biol* 47:20-28
 92. Young JC, Hoogenraad NJ, Hartl FU (2003) Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell* 112:41-50
 93. Trcka F, Durech M, Vankova P, Vandova V, Simoncik O, Kavan D, Vojtesek B, Muller P, Man P (2020) The interaction of the mitochondrial protein importer TOMM34 with HSP70 is regulated by TOMM34 phosphorylation and binding to 14-3-3 adaptors. *J Biol Chem* 295:8928-8944
 94. Kaneko K, Hachiya NS (2006) The alternative role of 14-3-3 zeta as a sweeper of misfolded proteins in disease conditions. *Med Hypotheses* 67:169-171
 95. Omi K, Hachiya NS, Tanaka M, Tokunaga K, Kaneko K (2008) 14-3-3zeta is

- indispensable for aggregate formation of polyglutamine-expanded huntingtin protein. *Neurosci Lett* 431:45-50
96. Stowers RS, Megeath LJ, Górska-Andrzejak J, Meinertzhagen IA, Schwarz TL (2002) Axonal transport of mitochondria to synapses depends on milton, a novel *Drosophila* protein. *Neuron* 36:1063-1077
 97. Hirokawa N, Sato-Yoshitake R, Kobayashi N, Pfister KK, Bloom GS, Brady ST (1991) Kinesin associates with anterogradely transported membranous organelles in vivo. *J Cell Biol* 114:295-302
 98. Brickley K, Smith MJ, Beck M, Stephenson FA (2005) GRIF-1 and OIP106, members of a novel gene family of coiled-coil domain proteins: association in vivo and in vitro with kinesin. *J Biol Chem* 280:14723-14732
 99. Glater EE, Megeath LJ, Stowers RS, Schwarz TL (2006) Axonal transport of mitochondria requires milton to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent. *J Cell Biol* 173:545-557
 100. Nguyen TT, Oh SS, Weaver D, Lewandowska A, Maxfield D, Schuler MH, Smith NK, Macfarlane J, Saunders G, Palmer CA, Debattisti V, Koshiba T, Pulst S, Feldman EL, Hajnóczky G, Shaw JM (2014) Loss of Miro1-directed mitochondrial movement results in a novel murine model for neuron disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:E3631-3640
 101. Brickley K, Stephenson FA (2011) Trafficking kinesin protein (TRAK)-mediated transport of mitochondria in axons of hippocampal neurons. *J Biol Chem* 286:18079-18092
 102. Harner M, Neupert W, DePonte M (2011) Lateral release of proteins from the TOM complex into the outer membrane of mitochondria. *Embo j*

30:3232-3241

103. Yamano K, Yatsukawa Y, Esaki M, Hobbs AE, Jensen RE, Endo T (2008) Tom20 and Tom22 share the common signal recognition pathway in mitochondrial protein import. *J Biol Chem* 283:3799-3807
104. Yamamoto H, Fukui K, Takahashi H, Kitamura S, Shiota T, Terao K, Uchida M, Esaki M, Nishikawa S, Yoshihisa T, Yamano K, Endo T (2009) Roles of Tom70 in import of presequence-containing mitochondrial proteins. *J Biol Chem* 284:31635-31646
105. Söllner T, Griffiths G, Pfaller R, Pfanner N, Neupert W (1989) MOM19, an import receptor for mitochondrial precursor proteins. *Cell* 59:1061-1070
106. Brix J, Dietmeier K, Pfanner N (1997) Differential recognition of preproteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70. *J Biol Chem* 272:20730-20735
107. Hönlinger A, Kübrich M, Moczko M, Gärtner F, Mallet L, Bussereau F, Eckerskorn C, Lottspeich F, Dietmeier K, Jacquet M, et al. (1995) The mitochondrial receptor complex: Mom22 is essential for cell viability and directly interacts with preproteins. *Mol Cell Biol* 15:3382-3389
108. Ramage L, Junne T, Hahne K, Lithgow T, Schatz G (1993) Functional cooperation of mitochondrial protein import receptors in yeast. *Embo j* 12:4115-4123
109. Moczko M, Ehmman B, Gärtner F, Hönlinger A, Schäfer E, Pfanner N (1994) Deletion of the receptor MOM19 strongly impairs import of cleavable preproteins into *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *J Biol Chem* 269:9045-9051

110. Lithgow T, Junne T, Suda K, Gratzer S, Schatz G (1994) The mitochondrial outer membrane protein Mas22p is essential for protein import and viability of yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11973-11977
111. Söllner T, Pfaller R, Griffiths G, Pfanner N, Neupert W (1990) A mitochondrial import receptor for the ADP/ATP carrier. *Cell* 62:107-115
112. Hill K, Model K, Ryan MT, Dietmeier K, Martin F, Wagner R, Pfanner N (1998) Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins. *Nature* 395:516-521
113. Shiota T, Imai K, Qiu J, Hewitt VL, Tan K, Shen HH, Sakiyama N, Fukasawa Y, Hayat S, Kamiya M, Elofsson A, Tomii K, Horton P, Wiedemann N, Pfanner N, Lithgow T, Endo T (2015) Molecular architecture of the active mitochondrial protein gate. *Science* 349:1544-1548
114. Otera H, Taira Y, Horie C, Suzuki Y, Suzuki H, Setoguchi K, Kato H, Oka T, Mihara K (2007) A novel insertion pathway of mitochondrial outer membrane proteins with multiple transmembrane segments. *J Cell Biol* 179:1355-1363
115. Papic D, Krumpe K, Dukanovic J, Dimmer KS, Rapaport D (2011) Multispan mitochondrial outer membrane protein Ugo1 follows a unique Mim1-dependent import pathway. *J Cell Biol* 194:397-405
116. Becker T, Wenz LS, Krüger V, Lehmann W, Müller JM, Goroncy L, Zufall N, Lithgow T, Guiard B, Chacinska A, Wagner R, Meisinger C, Pfanner N (2011) The mitochondrial import protein Mim1 promotes biogenesis of multispinning outer membrane proteins. *J Cell Biol* 194:387-395
117. Kato H, Lu Q, Rapaport D, Kozjak-Pavlovic V (2013) Tom70 is essential for

- PINK1 import into mitochondria. PLoS One 8:e58435
118. Chakrabarti O, Hegde RS (2009) Functional depletion of mahogunin by cytosolically exposed prion protein contributes to neurodegeneration. Cell 137:1136-1147
 119. Wang X, Bowers SL, Wang F, Pu XA, Nelson RJ, Ma J (2009) Cytoplasmic prion protein induces forebrain neurotoxicity. Biochim Biophys Acta 1792:555-563
 120. Pinho CM, Teixeira PF, Glaser E (2014) Mitochondrial import and degradation of amyloid- β peptide. Biochim Biophys Acta 1837:1069-1074
 121. Baloyannis SJ, Costa V, Michmizos D (2004) Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease. Am J Alzheimers Dis Other Demen 19:89-93
 122. Pozo Devoto VM, Falzone TL (2017) Mitochondrial dynamics in Parkinson's disease: a role for α -synuclein? Dis Model Mech 10:1075-1087
 123. Helmus JJ, Surewicz K, Nadaud PS, Surewicz WK, Jaroniec CP (2008) Molecular conformation and dynamics of the Y145Stop variant of human prion protein in amyloid fibrils. Proc Natl Acad Sci U S A 105:6284-6289
 124. Berry DB, Lu D, Geva M, Watts JC, Bhardwaj S, Oehler A, Renslo AR, DeArmond SJ, Prusiner SB, Giles K (2013) Drug resistance confounding prion therapeutics. Proc Natl Acad Sci U S A 110:E4160-4169
 125. Ghaemmaghami S, Ahn M, Lessard P, Giles K, Legname G, DeArmond SJ, Prusiner SB (2009) Continuous quinacrine treatment results in the formation of drug-resistant prions. PLoS Pathog 5:e1000673
 126. Lu D, Giles K, Li Z, Rao S, Dolgih E, Gever JR, Geva M, Elepano ML, Oehler A, Bryant C, Renslo AR, Jacobson MP, Dearmond SJ, Silber BM,

- Prusiner SB (2013) Biaryl amides and hydrazones as therapeutics for prion disease in transgenic mice. *J Pharmacol Exp Ther* 347:325-338
127. Edgington TL, Muco E, Maani CV (2021) Sevoflurane. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing,
128. Palanca BJA, Avidan MS, Mashour GA (2017) Human neural correlates of sevoflurane-induced unconsciousness. *Br J Anaesth* 119:573-582
129. Kharasch ED, Armstrong AS, Gunn K, Artru A, Cox K, Karol MD (1995) Clinical sevoflurane metabolism and disposition. II. The role of cytochrome P450 2E1 in fluoride and hexafluoroisopropanol formation. *Anesthesiology* 82:1379-1388
130. Kharasch ED, Karol MD, Lanni C, Sawchuk R (1995) Clinical sevoflurane metabolism and disposition: I. Sevoflurane and metabolite pharmacokinetics. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists* 82:1369-1378.
131. Urner M, Schläpfer M, Herrmann IK, Hasler M, Schimmer RR, Booy C, Roth Z'graggen B, Rehrauer H, Aigner F, Minshall RD, Stark WJ, Beck-Schimmer B (2015) Insight into the beneficial immunomodulatory mechanism of the sevoflurane metabolite hexafluoro-2-propanol in a rat model of endotoxaemia. *Clin Exp Immunol* 181:468-479
132. Carrotta R, Manno M, Giordano FM, Longo A, Portale G, Martorana V, Biagio PL (2009) Protein stability modulated by a conformational effector: effects of trifluoroethanol on bovine serum albumin. *Phys Chem Chem Phys* 11:4007-4018
133. Vieira EP, Hermel H, Möhwald H (2003) Change and stabilization of the

- amyloid- β (1–40) secondary structure by fluorocompounds. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1645:6-14
134. Hirota N, Mizuno K, Goto Y (1997) Cooperative alpha-helix formation of beta-lactoglobulin and melittin induced by hexafluoroisopropanol. *Protein Sci* 6:416-421
 135. Juszczak P, Kołodziejczyk AS, Grzonka Z (2005) Circular dichroism and aggregation studies of amyloid beta (11-8) fragment and its variants. *Acta Biochim Pol* 52:425-431
 136. Pachahara SK, Nagaraj R (2015) Probing the role of aromatic residues in the self-assembly of A β (16-22) in fluorinated alcohols and their aqueous mixtures. *Biochem Biophys Rep* 2:1-13
 137. Pachahara SK, Adicherla H, Nagaraj R (2015) Self-Assembly of A β 40, A β 42 and A β 43 Peptides in Aqueous Mixtures of Fluorinated Alcohols. *PLoS One* 10:e0136567
 138. Krance SH, Luke R, Shenouda M, Israwi AR, Colpitts SJ, Darwish L, Strauss M, Watts JC (2020) Cellular models for discovering prion disease therapeutics: Progress and challenges. *J Neurochem* 153:150-172
 139. Butler DA, Scott MR, Bockman JM, Borchelt DR, Taraboulos A, Hsiao KK, Kingsbury DT, Prusiner SB (1988) Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins. *J Virol* 62:1558-1564
 140. Race RE, Caughey B, Graham K, Ernst D, Chesebro B (1988) Analyses of frequency of infection, specific infectivity, and prion protein biosynthesis in scrapie-infected neuroblastoma cell clones. *J Virol* 62:2845-2849
 141. Kishida H, Sakasegawa Y, Watanabe K, Yamakawa Y, Nishijima M, Kuroiwa

- Y, Hachiya NS, Kaneko K (2004) Non-glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored recombinant prion protein with dominant-negative mutation inhibits PrP^{Sc} replication in vitro. *Amyloid* 11:14-20
142. Yin SM, Zheng Y, Tien P (2003) On-column purification and refolding of recombinant bovine prion protein: using its octarepeat sequences as a natural affinity tag. *Protein Expr Purif* 32:104-109
143. Micsonai A, Wien F, Kernya L, Lee YH, Goto Y, Réfrégiers M, Kardos J (2015) Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E3095-3103
144. Kocisko DA, Caughey B (2006) Searching for anti-prion compounds: cell-based high-throughput in vitro assays and animal testing strategies. *Methods Enzymol* 412:223-234
145. Karamyshev AL, Tikhonova EB, Karamysheva ZN (2020) Translational Control of Secretory Proteins in Health and Disease. *Int J Mol Sci* 21
146. Frontzek K, Aguzzi A (2020) Recent developments in antibody therapeutics against prion disease. *Emerg Top Life Sci* 4:169-173
147. Furuya K, Kawahara N, Yamakawa Y, Kishida H, Hachiya NS, Nishijima M, Kirino T, Kaneko K (2006) Intracerebroventricular delivery of dominant negative prion protein in a mouse model of iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease after dura graft transplantation. *Neurosci Lett* 402:222-226
148. Wille H, Zhang GF, Baldwin MA, Cohen FE, Prusiner SB (1996) Separation of scrapie prion infectivity from PrP amyloid polymers. *J Mol Biol* 259:608-621
149. Nichols MR, Moss MA, Reed DK, Cratic-McDaniel S, Hoh JH, Rosenberry

- TL (2005) Amyloid-beta protofibrils differ from amyloid-beta aggregates induced in dilute hexafluoroisopropanol in stability and morphology. *J Biol Chem* 280:2471-2480
150. Shigemitsu Y, Iwaya N, Goda N, Matsuzaki M, Tenno T, Narita A, Hoshi M, Hiroaki H (2016) Nuclear magnetic resonance evidence for the dimer formation of beta amyloid peptide 1-42 in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol. *Anal Biochem* 498:59-67
151. Naito A, Kawamura I (2007) Solid-state NMR as a method to reveal structure and membrane-interaction of amyloidogenic proteins and peptides. *Biochim Biophys Acta* 1768:1900-1912
152. Popova LA, Kodali R, Wetzel R, Lednev IK (2010) Structural variations in the cross-beta core of amyloid beta fibrils revealed by deep UV resonance Raman spectroscopy. *J Am Chem Soc* 132:6324-6328
153. Barducci A, Chelli R, Procacci P, Schettino V, Gervasio FL, Parrinello M (2006) Metadynamics simulation of prion protein: beta-structure stability and the early stages of misfolding. *J Am Chem Soc* 128:2705-2710
154. Terry C, Wadsworth JDF (2019) Recent Advances in Understanding Mammalian Prion Structure: A Mini Review. *Front Mol Neurosci* 12:169
155. Wang LQ, Zhao K, Yuan HY, Wang Q, Guan Z, Tao J, Li XN, Sun Y, Yi CW, Chen J, Li D, Zhang D, Yin P, Liu C, Liang Y (2020) Cryo-EM structure of an amyloid fibril formed by full-length human prion protein. *Nat Struct Mol Biol* 27:598-602
156. Sarnataro D, Pepe A, Zurzolo C (2017) Cell Biology of Prion Protein. *Prog Mol Biol Transl Sci* 150:57-82

157. Miesbauer M, Rambold AS, Winklhofer KF, Tatzelt J (2010) Targeting of the prion protein to the cytosol: mechanisms and consequences. *Curr Issues Mol Biol* 12:109-118
158. Barret A, Tagliavini F, Forloni G, Bate C, Salmona M, Colombo L, De Luigi A, Limido L, Suardi S, Rossi G, Auvré F, Adjou KT, Salès N, Williams A, Lasmézas C, Deslys JP (2003) Evaluation of quinacrine treatment for prion diseases. *J Virol* 77:8462-8469
159. Kamatari YO, Hayano Y, Yamaguchi K, Hosokawa-Muto J, Kuwata K (2013) Characterizing anti-prion compounds based on their binding properties to prion proteins: implications as medical chaperones. *Protein Sci* 22:22-34
160. Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M (2014) Comparison of the anti-prion mechanism of four different anti-prion compounds, anti-PrP monoclonal antibody 44B1, pentosan polysulfate, chlorpromazine, and U18666A, in prion-infected mouse neuroblastoma cells. *PLoS One* 9:e106516
161. Grassi S, Giussani P, Mauri L, Prioni S, Sonnino S, Prinetti A (2020) Lipid rafts and neurodegeneration: structural and functional roles in physiologic aging and neurodegenerative diseases. *J Lipid Res* 61:636-654
162. Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:31-39
163. Shaikh SR, Edidin MA (2006) Membranes are not just rafts. *Chem Phys Lipids* 144:1-3
164. Bach C, Gilch S, Rost R, Greenwood AD, Horsch M, Hajj GN, Brodesser S, Facius A, Schädler S, Sandhoff K, Beckers J, Leib-Mösch C, Schätzl HM,

- Vorberg I (2009) Prion-induced activation of cholesterologenic gene expression by Srebp2 in neuronal cells. *J Biol Chem* 284:31260-31269
165. Gilch S, Kehler C, Schätzl HM (2006) The prion protein requires cholesterol for cell surface localization. *Mol Cell Neurosci* 31:346-353
166. Marshall KE, Hughson A, Vascellari S, Priola SA, Sakudo A, Onodera T, Baron GS (2017) PrP Knockout Cells Expressing Transmembrane PrP Resist Prion Infection. *J Virol* 91
167. Taraboulos A, Scott M, Semenov A, Avrahami D, Laszlo L, Prusiner SB (1995) Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J Cell Biol* 129:121-132
168. Prior M, Lehmann S, Sy MS, Molloy B, McMahon HE (2007) Cyclodextrins inhibit replication of scrapie prion protein in cell culture. *J Virol* 81:11195-11207
169. Zhang M, Peyear T, Patmanidis I, Greathouse DV, Marrink SJ, Andersen OS, Ingólfsson HI (2018) Fluorinated Alcohols' Effects on Lipid Bilayer Properties. *Biophys J* 115:679-689
170. Ennaceur SM, Sanderson JM (2005) Micellar aggregates formed following the addition of hexafluoroisopropanol to phospholipid membranes. *Langmuir* 21:552-561
171. Lioudyno MI, Broccio M, Sokolov Y, Rasool S, Wu J, Alkire MT, Liu V, Kozak JA, Dennison PR, Glabe CG, Lösche M, Hall JE (2012) Effect of synthetic $\alpha\beta$ peptide oligomers and fluorinated solvents on Kv1.3 channel properties and membrane conductance. *PLoS One* 7:e35090

172. Kobayashi A, Qi Z, Shimazaki T, Munesue Y, Miyamoto T, Isoda N, Sawa H, Aoshima K, Kimura T, Mohri S, Kitamoto T, Yamashita T, Miyoshi I (2019) Ganglioside Synthase Knockout Reduces Prion Disease Incubation Time in Mouse Models. *Am J Pathol* 189:677-686
173. Vascellari S, Banni S, Vacca C, Vetrugno V, Cardone F, Di Bari MA, La Colla P, Pani A (2011) Accumulation and aberrant composition of cholesteryl esters in Scrapie-infected N2a cells and C57BL/6 mouse brains. *Lipids Health Dis* 10:132
174. Pardridge WM (2012) Drug transport across the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab* 32:1959-1972
175. Kundu B, Maiti NR, Jones EM, Surewicz KA, Vanik DL, Surewicz WK (2003) Nucleation-dependent conformational conversion of the Y145Stop variant of human prion protein: structural clues for prion propagation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12069-12074
176. Helmus JJ, Surewicz K, Nadaud PS, Surewicz WK, Jaroniec CP (2008) Molecular conformation and dynamics of the Y145Stop variant of human prion protein in amyloid fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:6284-6289
177. Ma J, Wollmann R, Lindquist S (2002) Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. *Science* 298:1781-1785
178. Mangé A, Crozet C, Lehmann S, Béranger F (2004) Scrapie-like prion protein is translocated to the nuclei of infected cells independently of proteasome inhibition and interacts with chromatin. *J Cell Sci* 117:2411-2416

本論文の一部は以下に公表した。

1. Takuto Shimizu, Emiko Nogami, Yuka Ito, Kazuo Morikawa, Masaki Nagane, Tadashi Yamashita, Tsuyoshi Ogawa, Fuyuki Kametani, Hisashi Yagi, Naomi Hachiya: Volatile Anesthetic Sevoflurane Precursor 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-Propanol (HFIP) Exerts an Anti-Prion Activity in Prion-Infected Culture Cells, *Neurochemical Research*, 46, 2056–2065, 2021

The version of record of this article, first published in *Neurochemical Research*, is available online at Publisher's website:

<http://dx.doi.org/10.1007/s11064-021-03344-8>

2. Takuto Shimizu, Yoshimichi Kozuka, Mayumi Kusano, Masaki Nagane, Tadashi Yamashita, Naomi Hachiya: PrP (122–139) is a covert mitochondrial targeting signal of prion protein and it specifically triggers the perinuclear clustering of mitochondria in neuronal culture cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Apr 2;524(2):301-307, 2020