

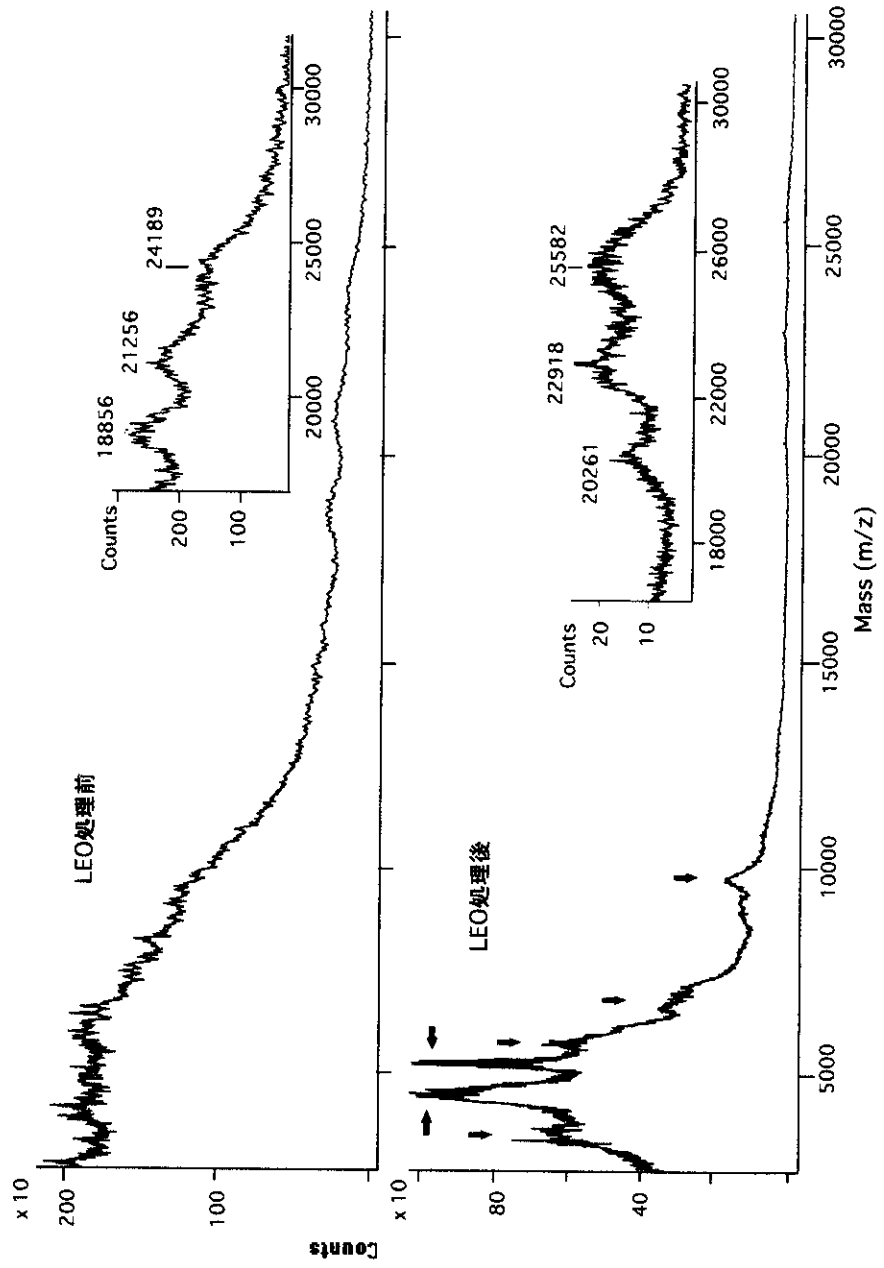
〔考察〕

以前の 2%LEO 処理プリオンのアミノ酸解析の結果、リジン、メチオニン、システイン、ヒスチジン、チロシンの 5 種類のアミノ酸残基が修飾を受け、これらアミノ酸総数のおよそ半分が修飾されていた。proteinase K 処理を受けた PrP^{Sc}、即ち PrP^{core}にはこれらアミノ酸残基の総数は 29 残基である。一方 2%LEO 処理を受けた PrP^{Sc} (PrP^{core})の 3 本のバンドの平均分子量の増加は 1500 で、およそ 34 の EO 分子が結合していることとなる。このことは修飾を受けている一アミノ酸当たり 2 または 3 分子の EO が結合していることを示している。EO はアルブミンも切断することから、EO による蛋白の切断は PrP に特異的なものではない。rPrP の切断点及びその前後もアラニンであることからアミノ酸残基の修飾と切断を直接結びつけることは出来ず、切断の機構は分からなかった。Butanedione がプリオンのリジン、ヒスチジン、アルギニンを修飾して不活化することが報告されている (4)。LEO も 5 種類のアミノ酸残基を不活化することからプリオンの不活化に構成アミノ酸残基の修飾が関わっている可能性は高い。一方 PrP^{Sc} の切断はプリオン複製における PrP^{Sc} の鋳型としての機能が無くなることを意味しており、不活化と直接結びつく。LEO によるプリオンの不活化はアミノ酸残基の修飾と切断の両者によると考えられるが、どちらが主体となっているかは明らかにできなかった。

〔文献〕

- 1) Takahashi, K., Shinagawa, M., Doi, S., Sasaki, S., Goto, H. and Sato, G. Purification of scrapie agent from infected animal brains and raising antibodies to the purified fraction. *Microbiol. Immunol.* 30: 123-131, 1986
- 2) Horiuchi, M., Yamazaki, N., Ikeda, T., Ishiguro, N., and Shinagawa, M. A cellular form of prion protein (PrPC) exists in many non-neuronal tissues of sheep. *J. Gen. Virol.* 76: 2583-2587, 1995.
- 3) Caughey, B., Raymond, G.J., Ernst, D. and Race, R. N-terminal truncation of the scrapie-associated form of PrP by lysosomal protease(s): Implications regarding the site of conversion of PrP to the protease-resistant state. *J. Virol.* 65: 6597-6603, 1991.
- 4) Prusiner, S. B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216: 136-143, 1982

図1. プリオン蛋白のMALDI-TOF-MS解析



羊及び牛キメラ PrP 遺伝子発現トランスジェニックマウスの羊プリオンに対する感受性

班 員：品川 森一（帯広大・獣医・公衆衛生）
研究協力者：島内 育子（帯広大・獣医・公衆衛生）
堀内 基広（帯広大・獣医・公衆衛生）
石黒 直隆（帯広大・獣医・公衆衛生）
班 員：北本 哲之（東北大・医・病態神経）
三好 一郎（東北大・医・動物実験施設）

〔研究要旨〕

マウス PrP と羊あるいは牛のキメラ PrP を発現するトランスジェニックマウス (Tg) の羊プリオンに対する感受性を調べた。マウス、羊及び牛 PrP の何れにも反応する B103 抗体でキメラ遺伝子の発現を調べたところ、羊 PrP キメラ Tg4 系統のキメラ PrP の発現レベルは、内在性のマウス PrP^C の発現を 1 とした場合、それぞれ 1.0, 1.1, 0.3, 0.3 であり、牛 PrP キメラ (Bo/Mo PrP) Tg、3 系統の発現レベルは 0.8, 0.5, 2.3 であった。スクレイビー羊のプリオンを接種した羊キメラ Tg の潜伏期は平均 510 日前後で、野生型マウスの 542 日と統計学的に有意差がなかった。産生されたプリオンの PrP^{Sc} の一部にキメラ PrP が使用されていた。牛キメラ Tg の内、一頭が 598 日で発症したが、野生型より潜伏期が長く、残りは 605 日以上生残している。発症したマウスのプリオンは全てマウス PrP^{Sc} から構成されており、キメラ PrP は検出できなかった。

Sensitivity of transgenic mice expressing chimeric sheep or bovine PrP gene to sheep scrapie prion

Morikazu SHINAGAWA¹⁾, Ikuko SHIMAUCHI¹⁾, Motohiro HORIUCHI¹⁾, Naotaka ISHIGURO¹⁾,
Tetsuyuki KITAMOTO²⁾ and Ichiro MIYOSHI³⁾

¹⁾Laboratory of Veterinary Public Health, Department of Veterinary Medicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, ²⁾Department of Neurological Sciences, Tohoku University School of Medicine,

³⁾Institute for Animal Experimentation, Tohoku University School of Medicine

ABSTRACT

Four lines of Tg mice expressing chimeric sheep/mouse PrP gene (Sh/Mo PrP) were evaluated for usefulness as a sheep scrapie model. The relative expression level of the Sh/Mo PrP transgene was approximately equal to or less than authentic Mo PrP. Incubation periods of the Tg mice inoculated with scrapie sheep KU brain homogenates via i.c. route were slightly shorter than those of non-Tg mice, but the differences were not statistically significant. The prion propagated de novo in the Tg mice mainly consisted of mouse PrP^{Sc}. Three lines of Tg mice which express chimeric bovine/mouse PrP gene (Bo/Mo PrP) were also assessed in the same way. The relative expression levels of Bo/Mo PrP transgene to authentic Mo PrP in these Tg mice lines was 0.5~2.3. The incubation periods of Bo/Mo PrP Tg mice were significantly prolonged, and the PrP^{Sc} detected in the brain of the affected mice was sole authentic mouse PrP^{Sc}. These results suggest that the expression Sh/Mo PrP or Bo/Mo PrP transgene did not enhance the susceptibility of the Tg mice to sheep prion.

〔はじめに〕

プリオンの検出にはその構成蛋白である PrP^{Sc} を免疫生化学的あるいは免疫組織化学的に検出する方法と感染性を指標にしたバイオアッセイとがある。前者は短時間に成績が得られるが感度が低く、後者は感度は高いが時間がかかり、異種の実験動物に伝達する場合には種の壁の現象のために潜伏期が長期化し、かつ感染発症しない場合はある。種の壁を取り除くために、異種の PrP 遺伝子を導入した Tg マウスが作成されている。ヒト PrP 遺伝子の場合、マウスとのキメラ遺伝子を導入した場合良好な成績が得られている。本研究では、羊あるいは牛 PrP 遺伝子とマウスのそれとのキメラ遺伝子を導入した Tg マウスの羊スクレイピープリオンに対する感受性を調べた。

〔材料と方法〕

羊型キメラ Tg マウス 4 系統及び牛型キメラ Tg マウス 3 系統 (1) を用いた。各マウスはヘテロにキメラ遺伝子を保有していた。接種材料には羊スクレイピー野外例 2 個体、KU 及び Y 5 の 10%あるいは 1%脳乳剤を用いた。各羊の PrP アミノ酸型は PrP^{MARQ/TARQ} および PrP^{MARQ/MARQ} であった。PrP 解析にはマウス PrP に特異的に反応する抗体 H 90、羊及び牛 PrP と特異的に反応する BSPX54、およびマウス、羊、牛の何れとも反応する B103 を用いた。麻酔下で脳内接種を行い、発症後は死亡直前まで観察して、麻酔下に放血により安楽死させた。脳を 2 分して凍結保存及びホルマリン固定に供した。潜伏期は接種後から死亡あるいは安楽死させたまでの期間とした。なお、動物実験は本学「動物実験委員会」の指針の範囲内で実施された。

〔結果と考察〕

羊型 4 系統、牛型 3 系統のキメラ遺伝子の発現レベルを H90 及び B103 抗体を用いて調べた (図 1)。H90 で検出された野生型マウスの PrP 量を 1 として、各系統のマウスに検出された PrP 量を補正した。同一フィルタ-を B103 で再度 PrP の検出を行い、得られた価を野生型マウスの価で補正し、各系統毎に補正後の B103 で得られた値を補正後の H90 の値で除した値を発現レベルとした。4 系統の羊型キメラ遺伝子の発現レベルは 1.0、1.1、0.3 及び 0.3 であり、牛型 3 系統は 0.8、0.5 及び 2.3 であった。

表 1 に羊 KU の脳乳剤を接種した成績を示した。野生型の潜伏期は 542±34 日であり、2 系統の羊型の潜伏期は 518±31 日及び 505±46 日で、有意の差は見られなかった。一方、牛型では 598±12 日あるいはそれより長く、633 日以上生存しており、有意に潜伏期の延長が見られた。表 2 に示すように、羊 Y 5 の脳乳剤を接種したマウスは大部分が観察中であるが、野生型マウス 2 匹の潜伏期は 473 日で、羊型のマウスでは発症したものは 477 日で他は観察中である。牛型の発症も見られていない。

これらの成績は、今回調べたトランスジェニックマウスは、種の壁を解消していないことを示している。牛型では更に潜伏期が延長していることから、牛キメラ遺伝子が羊プリオンの発症に抑制的に作用しているといえる。またキメラ遺伝子の発現レベルと潜伏期の間には関連がないと言えよう。

発症したマウスの PrP^{Sc} がマウス PrP に由来するかあるいはキメラ遺伝子に由来するかを H90 及び BSPX54 抗体を用いて調べた (図 2)。羊型 2 頭は何れもその PrP^{Sc} の大部分がマウスに由来し、極く一部がキメラ遺伝子に由来していた。両 PrP が混在しているのかあるいはそれぞれ別れて脳内に存在しているかは判定できなかった。牛型では全てがマウス PrP に由来していた。

〔文献〕

1. 三好 一郎他：プリオン蛋白過剰発現トランスジェニックマウスにおける筋病変。厚生省特定疾患「遅発性ウイスル感染」調査研究班 (班長 北本哲之) 平成 10 年度報告書：84-86、1999

〔研究発表〕

1. 論文発表
1) 品川森一 牛海綿状脳症 人と動物の共通伝染病 高島郁夫監修 p41-55 酪農総合研究所 (1998)

- 2) Takahashi, M., Takahashi, R., Hasegawa, H., Horiuchi, M., Shinagawa, M., Yokoyama, T., Kimura, K., Haritani, M., Kurata, T. and Nagashima, K. Characterization of antibodies raised against bivariate-PrP-peptides. *J. Neurovirol.* 5: 300-307, (1999).
- 3) Nemoto, T., Horiuchi, M., Ishiguro, N. and Shinagawa, M. Detection methods of possible prion contaminants in collagen and gelatin. *Arch. Virol.*144: 177-184 (1999).
- 4) 品川森一 動物のプリオン病 宮城獣医師会会報 52, 121-131,1999
- 5) Laplanche, J.-L., Hunter, N., Shinagawa, M., Williams, E. In *Prion Biology and Diseases, Monograph 38* (Prusiner, S.B. ed), Scrapie, Chronic Wasting Disease, and Transmissible Mink Encephalopathy. (1999) Cold Spring Harbor Laboratory Press

2. 学会発表

- 1) 山本真理、堀内基広、石黒直隆、品川森一、プリオン不活化剤の選択とその作用機構 第47回日本ウイルス学会 (1999年11月、横浜)
- 2) Shinagawa, M., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Nemoto, T., Takahashi, M., Matsuo, T., Shirafuji, T. and Kaneko, K.: Prion inactivation with liquid ethylene oxide. XIth International Congress of Virology (1999, 8. Sydney)
- 3) Shinagawa, M., Horiuchi, M., Grathwohl K.U.D., and Ishiguro, N.: ELISA as a screening method for scrapie-infected animals. *Characterization and Diagnosis of Prion Diseases in Animals and Man* (1999, 9. Tubingen)
- 4) Shinagawa, M., Yamamoto, M., Horiuchi, M., Matsuo, T., Shirafuji, T., Kaneko, K. and Kajihara, Y.: Screening of prion decontaminants. *CHI Symposium "Transmissible spongiform encephalopathies"* (1999, 10. Washington DC)

Table1. Scrapie incubation periods in Tg mice inoculated with brain homogenates of scrapie sheep Y5

Recipient mice line	Incubation periods		
	mean days \pm SD	(n/n *)	<i>p</i> **
Sh/Mo Tg mice			
#50	518 \pm 31	(3/3)	0.3133
#61	505 \pm 46	(3/3)	0.1674
Bo/Mo Tg mice			
#10	>605	(0/2)	-
#43	598 \pm 12	(3/3)	0.0233
#46	441,444 , >605	(2/3)***	-
Non-Tg mice	542 \pm 34	(8/8)	

* Number of mice developing scrapie/total number of mice inoculated.

** The P values shown were determined by *t*-test. *p* = 0.05.

***One mice died at 441days after inoculation and one mice was sacrificed at 444 days after inoculation. However, PrP^{Sc} was not detected in their brains.

Non-Tg mice were littermates of Tg mice.

Table 2. Scrapie incubation periods in Tg mice inoculated with brain homogenates of scrapie sheep Y5

Recipient mice line	group	Incubation periods mean days (n/n)*	
Sh/Mo Tg mice			
#4	G-1	>475	(0/4)
	G-2	>405	(0/4)
#20	G-1	>526	(0/8)
	G-2	>475	(0/3)
#50	G-1	>475	(0/3)
#61	G-1	>371	(0/5)
Bo/Mo Tg mice			
#10	G-1	>526	(0/1)
	G-2	>475	(0/4)
#43	G-1	>475	(0/1)
	G-2	>405	(0/5)
Non-Tg mice			
	G-1	473	(2/2)
	G-2	>405	(0/2)
	G-3	>371	(0/2)

* Number of mice developing scrapie/total number of mice inoculated.

Non-Tg mice were littermates of Tg mice.

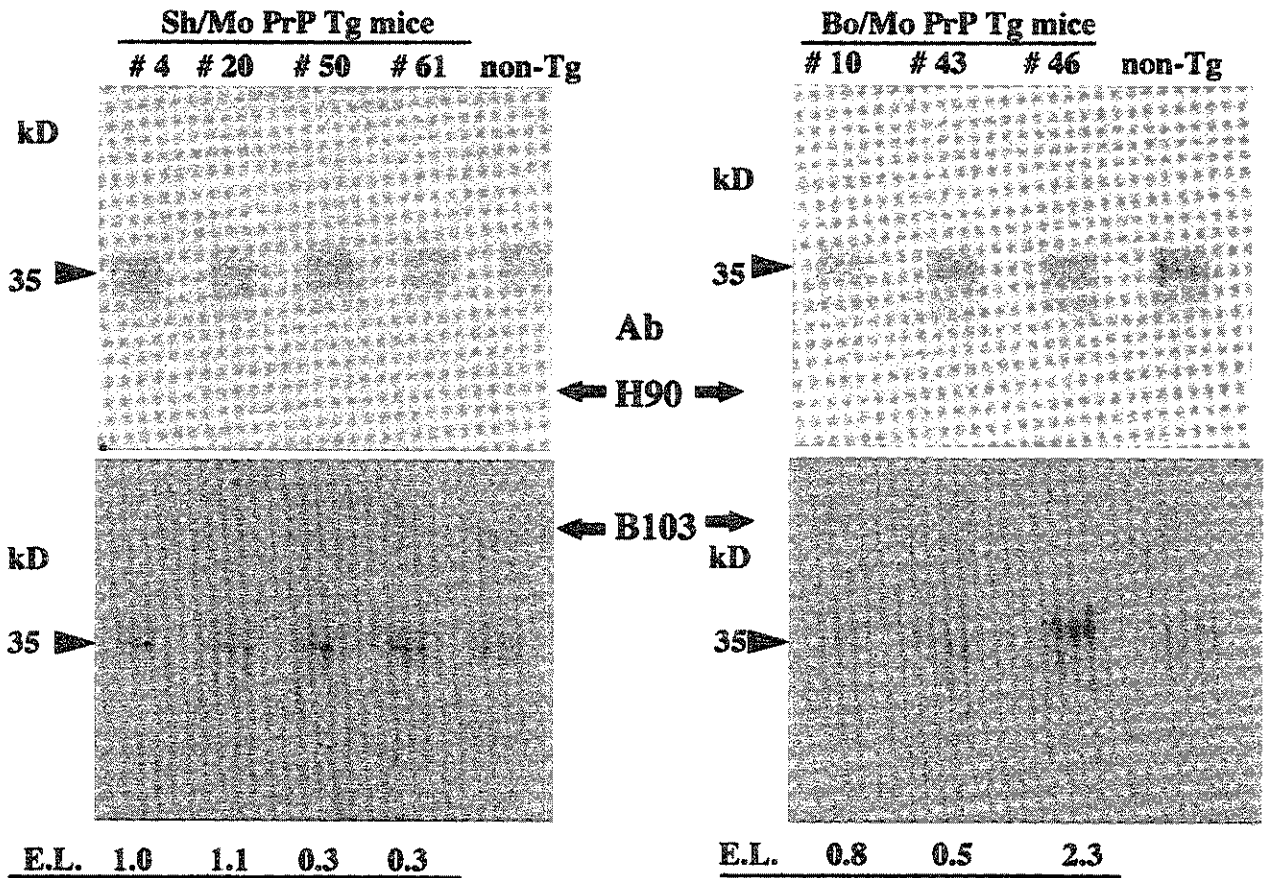


Fig. 1 Expression of PrPC in Tg mice. Expression levels of PrPC in Tg mouse brains were estimated using H90 (upper panels) which reacts only with Mo PrP and B103 (lower panels) which reacts with Mo PrP, Sh PrP and Bo PrP. The membranes probed with H90 were reprobred with B103. Estimation of the expression levels was in the text. E.L.: estimated relative expression levels.

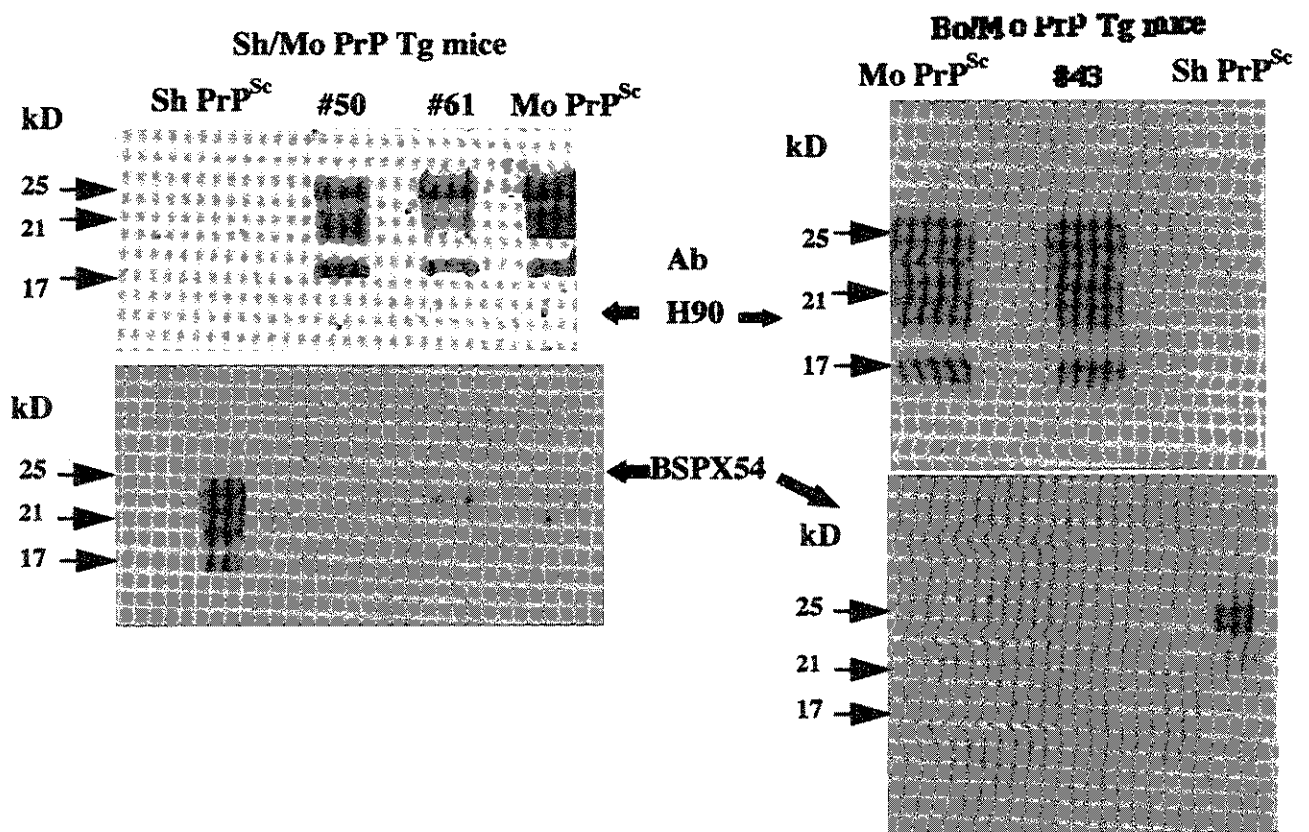


Fig.2 Type of PrPSc accumulated in Tg mice inoculated with scrapie sheep KU brain homogenates. The types of PrPSc accumulated in the brain of Sh/Mo PrP Tg mice and Bo/Mo PrP Tg mice inoculated with scrapie sheep KU brain homogenates were analyzed with mouse PrP specific antibodies H90 (upper panels) and sheep/bovine PrP specific mAb BSPX54 (lower panels). The same amount of samples were loaded in the corresponding panels. Sh PrPSc: scrapie-affected sheep brain, Mo PrPSc: mouse-adapted-scrapie mouse brain. Molecular weights of PrPSc bands indicated by arrows were estimated using cytochrom c monomer and oligomer (Oriental Yeast, Tokyo, Japan).

ヒト型プリオンタンパクはマウスのプリオンタンパク遺伝子欠損による運動失調の発症を抑制する

班 員：三好 一郎（東北大学・大学院医・附属動物実験施設）
班 員：北本 哲之（東北大学・大学院医・病態神経）
班 員：毛利 資郎（九州大学・大学院医・実験動物学）
研究協力者：村本 環（東北大学・大学院医・病態神経）
研究協力者：石川有紀子（九州大学・大学院医・実験動物学）

[研究要旨]

ヒト型プリオンタンパク(PrP)を発現するヒト/マウスキメラ型 PrP 遺伝子の導入により, PrP 遺伝子欠損マウスが老化に伴い呈するプルキンエ細胞脱落による運動失調, 及び, 後肢の麻痺等の発症が抑制された。このキメラ型導入遺伝子は, N-および C-末端がマウス由来, 主要 ORF 部分はヒト由来 PrP から構成されているだけでなく, マウスの PrP プロモータで制御されているため, 発現するヒト型 PrP のプロセッシングあるいは局在性, 組織特異性はマウス内在性のものと同じ事が期待できる。以上のことより, 我々の作製したヒト/マウスキメラ型導入遺伝子由来 PrP が, ノックアウトマウスで欠損している, 神経系を正常に保つ機能を代償したことを示唆している。

Expression of human prion protein rescues mice deficient for prion protein gene from cerebellar ataxia and paralysis of hind limb

Ichiro MIYOSHI, Tetsuyuki KITAMOTO*, Tamaki MURAMOTO*, Shirou MOHRI**
and Yukiko ISHIKAWA**

Institute for Animal Experimentation, *Department of Neurological Science, Tohoku University Graduate School of Medicine, **Laboratory of Biomedicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

ABSTRACT

Prion protein (PrP) gene disrupted mice were rescued from both cerebellar ataxia caused by Purkinje cell degeneration and consequential paralysis of hind limb by introduction of a transgene encoding human/mouse chimeric PrP, which was composed of N-and C-terminal sequences from mouse and main ORF region from human PrP. As the expression of this molecule was also regulated by mouse PrP promoter region of the transgene, its processing, localization and tissue specificity was expected to be similar to that of mouse PrP. These findings suggest that human PrP from the chimeric transgene may compensate for the deficiency of endogenous PrP necessary to maintain the integrity of the nervous system in knockout mice.

[はじめに]

我々はプリオン病研究のためのモデル動物を研究開発している。PrP 遺伝子欠損マウスに観察される運動失調等の発症が, ヒト型の PrP を発現するヒト/マウスキメラ型遺伝子を導入することによって抑制されることが判明したので報告する。

[方 法]

すでに平成 8 年度の本研究班で報告した方法により得られたヒト/マウスキメラ型 PrP 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス（以下 Tg30）を非近交交配で維持されている PrP 遺伝子欠損マウス, PrnP 0/0,（以下, KO マウス, 理化学研究所, 糸原重美博士より分与）に戻し交配し, マウス内在性 PrP 遺伝子の除去されたヒト/マウスキメラ型 PrP 遺伝子発現マウス [Tg30+/-・PrnP0/0, 以下 Tg30/KO マウス] について KO マウスに認められる欠損症状の有無を観察した^{1), 2)}。

Tg30 系統の内因性 PrP 遺伝子を排除する際に生まれた同腹子を含めた KO マウスについても同様に症状発現時期を調べた。

（倫理面への配慮）

全ての動物実験は, 東北大学大学院医学系研究科及び九州大学大学院医学系研究科の動物実験指針に従って行われた。

[結果と考察]

Tg30 マウスは 577 日以上を経過し, 観察中であるが, 何の症状も発現していない。

一方, KO マウスでは早い個体では生後 300 日程度から歩行時に震せんが認められ, やがて歩行時に大きく腰を揺るようになった。経過が進むと転倒するようになり, 後肢が完全に麻痺した。そして, 後肢を伸直したまま前肢のみで歩行し, 最終的には削瘦し, 尿失禁も認められた。典型的な症状で死亡, もしくは安楽死させた KO マウスの平均生存日数は 567 日であった (Table 1)。

症状を呈したすべての KO マウスで病理組織学的にプルキンエ細胞の脱落がみとめられた (Fig. 1)。無処置の Tg30/KO マウスは現在すべて生存しているため, 病理学的検査はなされおらず, 今後の検索を待たねばならない。しかしながら, 同腹子を含めて観察した全ての KO マウスが平均 415 日で明らかな運動失調を発現し, 平均 567 日で後肢マヒで死亡するのに対して, Tg30/KO マウスは何の症状も呈していない。これは導入されたヒト/マウスキメラ型 PrP 遺伝子 (産物) が, KO マウスの臨床症状を抑制していると考えられる。

Nishida らは, 同様の運動失調症状を呈する KO マウスの系統にマウス PrP 遺伝子の過剰発現系を導入する事で, その欠損症状が抑制されることを報告している³⁾。Tg30/KO マウスにおいては, 半定量的ウエスタンブロット解析の結果, ヒト型プリオンタンパクが検出され, その発現量は野生型マウスの PrP よりも少ないと思われた (Fig. 2)。したがって, ヒト/マウスキメラ型 PrP 遺伝子の導入によるヒト型 PrP の発現, しかも, 正常量に比較して少ない発現量で, マウスの PrP 遺伝子欠損による運動失調が抑制されることが示された。

このことは, 私共が作製したヒト/マウスキメラ導入遺伝子がマウス内在性の PrP 遺伝子と同様に機能していることを示唆している。

[結 論]

ヒト型プリオンタンパク (PrP) を発現するヒト/マウスキメラ型 PrP 遺伝子の導入により, PrP 遺伝子欠損マウスが老化に伴い呈するプルキンエ細胞脱落による運動失調, 及び, 後肢の麻痺等の発症が抑制された。

[文 献]

- 1) 三好一郎, 北本哲之: ヒトプリオン感受性モデルマウスの確立. 厚生省特定疾患「遅発性ウイルス感染」調査研究班, (班長 北本哲之) 平成 8 年度研究報告書: 20-24, 1997.
- 2) 毛利資郎, 北本哲之, 三好一郎: ヒト PrP 遺伝子発現マウスのプリオン感受性試験 (その 2). 厚生省特定疾患「遅発性ウイルス感染」調査研究班, (班長 北本哲之) 平成 10 年度研究報告書: 87-93, 1999.
- 3) Nishida N., Tremblay P., Sugimoto T., Shigematsu K., Shirabe S., Petromilli C., Erpel P., Nakaoke R.,

Atarashi R., Houtani T., Torchia M., Sakaguchi S., DeArmond Stephen., Prusiner S. and Katamine S. : A mouse prion protein transgene rescues mice deficient for prion protein gene from Purkinje cell degeneration and demyelination. Lab.Invest 79(6):689-97,1999.

[研究発表]

1. 論文発表

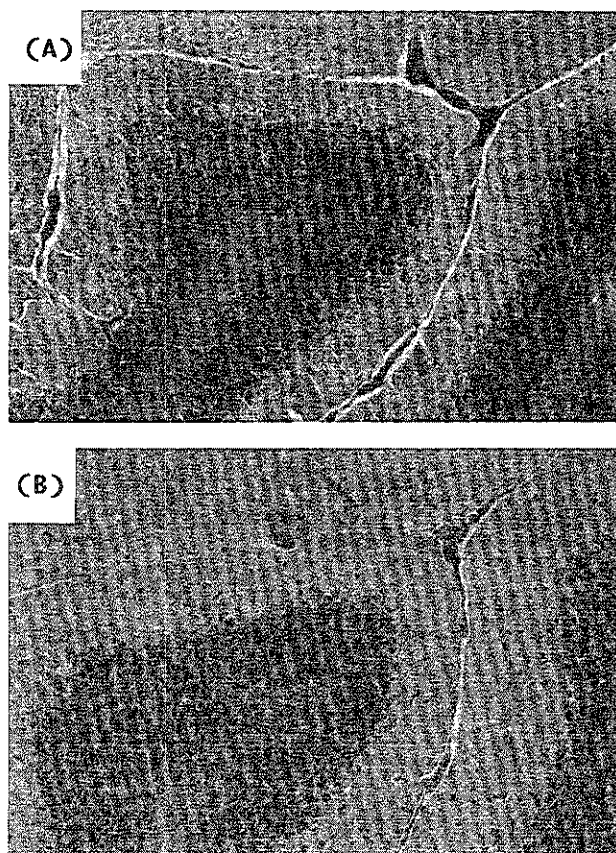
2. 学会発表

- 1) 村本環, 佐藤克也, 樋口じゅん, 渋谷聡, 辛龍雲, 北本哲之, 三好一郎, 毛利資郎: ヒトプリオン高感受性トランスジェニック(Tg)マウスの作製. 第40回日本神経学会総会, 1999.
- 2) 毛利資郎, 三好一郎, 石川有紀子, 大野彰子, 沼野純, 石津彰博, 笠井憲雪, 北本哲之: ヒト・プリオン高感受性マウスの確立. 第16回日本疾患モデル学会総会, 1999.

Table 1. Onset of ataxia and survival time in mice lacking PrP gene in the presence or absence of chimeric human/mouse PrP transgene.

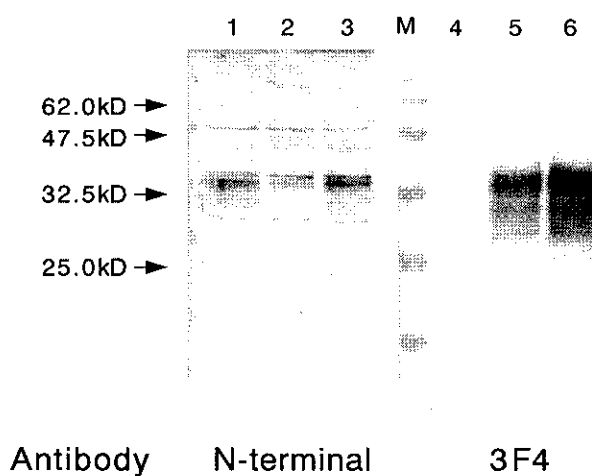
Strain	Genotype	Onset of ataxia (days after birth)	No of mice	Survival time	No. of mice
KO	Prnp 0/0	415 ±64.1	n=20	567 ±55.8	13/20
Tg30/KO	Tg30 +/- · Prnp 0/0	>577	n=7	>577	n=7

Fig.1 Purkinje cell degeneration in PrP gene disrupted mice



Microscopic appearance of cerebellum from PrP gene disrupted Prnp0/0(A) and hetero type Prnp+/0(B) mice.

Fig.2 Western blot analysis of Tg mice



M : Marker
 1 , 4 : NZW Prnp^{+/+}
 2 , 5 : Tg30 ^{+/-} · Prnp0/0
 3 , 6 : Tg30 ^{+/+} · Prnp0/0

Expression of Prp in brain tissue from NZW Prnp^{+/+} (1, 4), transgenic hemizygote deficient for mouse PrP [Tg30^{+/-} · Prnp0/0] (2, 5), and transgenic homozygote deficient for mouse PrP [Tg30^{+/+} · Prnp0/0] (3, 6) were estimated by Western blot analysis using anti-synthesized peptide PrP N-terminal specific (1. 2. 3) and 3F4 (4, 5, 6) monoclonal antibodies.

ヒト PrP 遺伝子発現マウスのプリオン感受性試験 (その3)

班 員：毛利 資郎 (九州大・大学院医・実験動物)

班 員：北本 哲之 (東北大・大学院医・病態神経)

班 員：三好 一郎 (東北大・大学院医・動物実験施設)

研究協力者：石川有紀子 (九州大・大学院医・実験動物)

研究協力者：大野 彰子 (九州大・大学院医・実験動物)

研究協力者：沼野 純 (九州大・大学院医・動物実験施設)

〔研究要旨〕

ヒト/マウスキメラプリオン蛋白遺伝子発現マウスをプリオン蛋白遺伝子欠損マウスに戻し交配し、ヒト/マウスキメラ型プリオン遺伝子のみが発現するトランスジェニック (Tg) マウス6系統についてヒトプリオンに対する感受性試験を行った。その結果、これらの Tg マウスはヒト PrP 遺伝子における多型である codon129 のメチオニンとバリン、どちらの型にも同じ程度の高い感受性を示した。したがって、ヒト PrP 遺伝子の codon129 の多型はプリオンの感染性には関連していない可能性が示された。

また、プリオン蛋白の発現量の異なる6系統の Tg マウスに対する感受性試験の結果、発現量が過剰になるとドーズディペンデントに潜伏期間が延長した。このことから、リコンビナント PrP^C の過剰発現は必ずしも高感受性にはならないことが明らかになった。

Susceptibility for the transgenic mice expressing human/mouse chimeric prion gene to human prion (Part 3)

Shirou MOHRI¹, Tetsuyuki KITAMOTO², Ichiro MIYOSHI³,
Yukiko ISHIKAWA¹, Shoko OHNO¹ and Jun NUMANO¹

¹ Laboratory of Biomedicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

² Department of Neurological Science, ³ Institute for Animal Experimentation, Tohoku University Graduate School of Medicine

ABSTRACT

Six strains of two types of mouse/human chimeric transgenic(Tg) mice disrupted mouse PrP gene were various susceptibility to human PrP.

Three strains of them, one expressing 129met type of human gene and the other two expressing 129val, were inoculated with two different human brain homogenate which had different polymorphism of PrP genotype codon 129 met/met or val/met. Each strain had similar sensitivity to 129met/met and 129val/met type of human prion. It seemed that the polymorphism in human PrP gene of codon 129 had no correlation with transmissibility.

In the six strains of Tg mice, which expressing various amount of PrP from 0.6 to 18 times compared with wild-mouse PrP, the shortest incubation periods were 147 days and 156 days in Tg30 strains of 1.2 times and 0.6 times expression respectively. The incubation periods were prolonged depending on the amount of PrP expression. High expressing two strains, 9 times and 18 times, have been not affected over 250 days post inoculation yet. It is evident that over expression of mouse/human chimeric transgene have not made our Tg mice high sensitive to human prions.

These may be a important key to open up the mechanism of transmission and replication of prion.

〔はじめに〕

血液製剤などの医薬品やその原材料、さらには食肉類のプリオンに関するヒトへの安全性試験には、ヒトへの感染性を調べる動物モデルが必要不可欠である。われわれはヒト型プリオン蛋白を産生する遺伝子導入モデルを作製し、種の壁を越えたプリオン高感受性マウスを開発し、ヒトプリオンに対する感受性が世界で最も高いことを昨年の班会議で報告した¹⁾。

今年はヒトの多型に対する感受性試験と、さらに高感受性マウス系統樹立を目指してヒト型プリオンタンパクを過剰に発現する過剰発現系マウスの感受性について調べた。

〔材料と方法〕

1. マウス：ヒト/マウスキメラプリオン蛋白遺伝子発現マウス

ヒト/マウスキメラプリオン蛋白遺伝子発現マウスをプリオン蛋白遺伝子欠損マウス (Prnp0/0) (糸原博士作製) に戻し交配し、ヒト/マウスキメラ型プリオン遺伝子のみが発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作製した。これらのマウスの導入遺伝子はマウス PrP exon 3 の ORF の Sma I から BstEII 間をヒト型のプリオンタンパク遺伝子に換えられたものである²⁾。ヒト PrP 遺伝子の多型に合わせて codon129 がメチオニンタイプ 4 系統、Tg#30Mo/Hu(129met)+/-・Prnp0/0、Tg#30Mo/Hu(129met)+/+・Prnp0/0、Tg#59Mo/Hu(129met)+/-・Prnp0/0、Tg#69Mo/Hu(129met)+/-・Prnp0/0、(以下それぞれ Tg30met, Tg30met2, Tg59met, Tg69met と表す)、とヒト PrP 遺伝子の codon129 がバリントタイプ 2 系統、Tg#12 Mo/Hu(129val)+/-・Prnp0/0、Tg#21 Mo/Hu(129val)+/-・Prnp0/0 (以下それぞれ Tg12val, Tg21val と表す) の計 6 系統である。

2. ウェスタンブロット

Tg マウスにおけるヒト型のプリオン蛋白の発現とその量を比較するために半定量的ウェスタンブロットを行った。一次抗体として、抗 N 未合成ペプチドウサギ血清、B103 (帯広大学、品川森一教授提供)、モノクローナル抗体 3F4 を用いた。発色系は alkaline phosphatase-PCIB/NBT (Promega)で行った。

3. 接種材料

Codon129 met/met 型(H3)、もしくは codon129 を met/val ヘテロ型(Phily)にもつ孤発性 CJD 患者 10%脳乳剤 20 μ l を脳内接種 (i.c.)した。

4. 潜伏期間の測定

接種日を 0 日とし、反応遅延、運動失調、消瘦、無動などのマウス CJD の症状を呈し安楽死させる日までを潜伏期間とした。

5. 免疫組織染色

確定診断のため、安楽死させたすべてのマウスについてホルマリン固定後、実験室内汚染防止のため蟻酸処理を行い、常法によりパラフィン切片を作製、HE 染色と免疫組織染色を行った。免疫組織染色は hydrolytic autoclaving 法により、一次抗体として抗 N 末合成ペプチドウサギ血清とマウスモノクローナル抗体 3F4 を用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては、九州大学大学院医学系研究科動物実験指針に従い、動物実験委員会による実験計画書の審査を受け、感染実験は物理的封じ込め設備を有する専用の感染実験室でおこなった。

【結果と考察】

Table 1.に示すように、met/met 型、 val/met 型の PrP 遺伝子を有する患者プリオンは、3種類の異なった系統の Tg マウスに対して、それぞれの系統毎に同様の潜伏期間でマウスを発症させた。すなわち、私どもの作製した Tg マウスはヒト 129met/met 型プリオンのみならず、孤発性 CJD 患者 PrP 遺伝子の多型の一つであるヒト 129val/met プリオンに対しても同様な高感受性を示すことが明らかとなった。これは、Tg マウスが孤発性プリオン病のヒトプリオンに対して幅広い感受性を示すことを示唆する。このことは、ヒトの codon129 における遺伝子多型は感染性に関与しない可能性をも示唆するものであるが、日本ではごく稀である codon129val/val のヒトプリオンでも確認しなければならない。

異なる6系統に同じ met/met 型患者脳乳剤を接種した結果、系統による潜伏期間の差異が明らかになったが、半定量的ウエスタンブロットの結果、Tg マウスはすべてヒト型 PrP^C を発現しており、ワイルドタイプのマウス PrP^C を 1 とすると 0.6 倍から 18 倍までそれぞれの系統間で発現量に差異が認められた (Fig1)。そしてこのヒト型 PrP^C が 0.6 倍と 1.2 倍を示すマウスの潜伏期間がそれぞれ 156 日、147 日と最も短く、2 倍、4 倍と増えるに従い潜伏期間が延長し、9 倍と 18 倍のマウスでは、250 日を越えても発症していない (Table 2)。これらの結果から、導入遺伝子の発現量がワイルドマウスの量を越えて過剰になればなるほど潜伏期間が延長する事が明らかになった。これは、マウスやハムスターの PrP^C 過剰発現は潜伏期間が短縮するというこれまでの報告と異なった結果である^{3), 4)}。原因はいろいろ考えられるが、プリオン伝達、複製のメカニズムとしても重要であり、今後解明していかなければならない。

【結論】

1. 私どものヒトプリオン高感受性マウスはヒトの多型、129met/met のみならず met/val どちらにも高い感受性を示すことが判明した。
2. トランスジェニックマウスにおいてリコンビナント PrP^C の過剰発現は必ずしも高感受性にはならないことが明らかになった。

【参考文献】

- 1) 毛利資郎、北本哲之、三好一郎：ヒト PrP 遺伝子発現マウスのプリオン感受性試験(その2)、厚生省特定疾患「遅発性ウイルス感染」調査研究班、(班長 北本哲之)平成 10 年度研究報告書：87-93、1999
- 2) 三好一郎、北本哲之：ヒトプリオン感受性モデルマウスの確立。厚生省特定疾患「遅発性ウイ

ルス感染」調査研究班、(班長 北本哲之) 平成8年度研究報告書：20-24、1997

3) Carlson G.A., Ebeling C., Yang S., Telling G., Torchia M., Groth D., Westaway D., DeArmond J. S. and Prusiner S. B.: Prion isolate specified allotypic interaction between the cellular and scrapie prion proteins in congenic and transgenic mice. Proc.Natl.Acad.Sci. Vol.91: 5690-5694, 1994

4) Prusiner S. B., Scott M., Foster D., Pan K., Groth D., Mirinda C., Torchia M., Yang S., Serban D., Carlson G.A., Hoppe P.C., Westaway D. and DeArmond S.J.: Transgenic studies interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. Cell Vol.63: 673-686. 1990

【研究発表】

1. 論文発表

1) Doh-ura K., Mohri S., Tashiro H., Kawashima T., Kikuchi H. and Iwaki T.: Brain injury does not modify transmissible spongiform encephalopathy caused by intraperitoneal inoculation with Fukuoka-1 strain J. Gen. Virol. Vol.80 :1551-1556, 1999

2) Matsuda H., Mitsuda H., Nakamura N., Furusawa S., Mohri S. and Kitamoto T.: A chicken monoclonal antibody with specificity for the N-terminal of human prion protein. Immuno. Med. Microbiol. Vol.13: 189-194, 1999

2. 学会発表

1) 毛利資郎、三好一郎、石川有紀子、大野彰子、沼野 純、石津彰博、笠井憲雪、北本哲之：ヒト・プリオン高感受性マウスの確立。第16回日本疾患モデル学会総会。大阪.1999

2) 村本環、佐藤克也、樋口じゅん、渋谷聡、辛龍雲、北本哲之、三好一郎、毛利資郎：ヒトプリオン高感受性トランスジェニック(Tg)マウスの作製。第40回日本神経学会総会、1999.

Table 1. Susceptibility of mouse/human chimeric PrP transgenic mice to PrP polymorphism in patients

Mouse	Mouse genotype	Met/Met brain*		Val/Met brain**	
		Affected /Inoculated	Incubation periods	Affected /Inoculated	Incubation periods
Tg30met	Mo/Hu (129met) +/- · Prnp0/0	11/11	156 ± 14.2	5/5	154 ± 20.8
Tg12val	Mo/Hu (129val) +/- · Prnp0/0	18/18	175 ± 15.3	10/10	171 ± 9.2
Tg21val	Mo/Hu (129val) +/- · Prnp0/0	3/3	192 ± 4.04	2/2	188 ± 1.4

Inoculated via i.c. with 10% brain homogenate of codon129 met/met patient* or val/met patient**.

Table 2. Transmission tests of Human PrP to various strains of the transgenic mice

Mouse strain	Mouse genotype	Number of mice	Incubation period	Mo/Hu PrP expression (Compared with wild mouse)
Tg30	Mo/Hu (129met) +/- · 0/0	11/11	156 ± 14.2	X0.6
Tg30	Mo/Hu (129met) +/+ · 0/0	4/4	147 ± 9.9	X1.2
Tg59	Mo/Hu (129met) +/- · 0/0	2	>250	X9.0
Tg69	Mo/Hu (129met) +/- · 0/0	2	>250	X18.0
Tg12	Mo/Hu (129val) +/- · 0/0	18/18	175 ± 15.3	X2
Tg21	Mo/Hu (129val) +/- · 0/0	3/3	192 ± 4.04	X4

Inoculated with 10% brain homogenate of codon129 met/met patient via i.c.