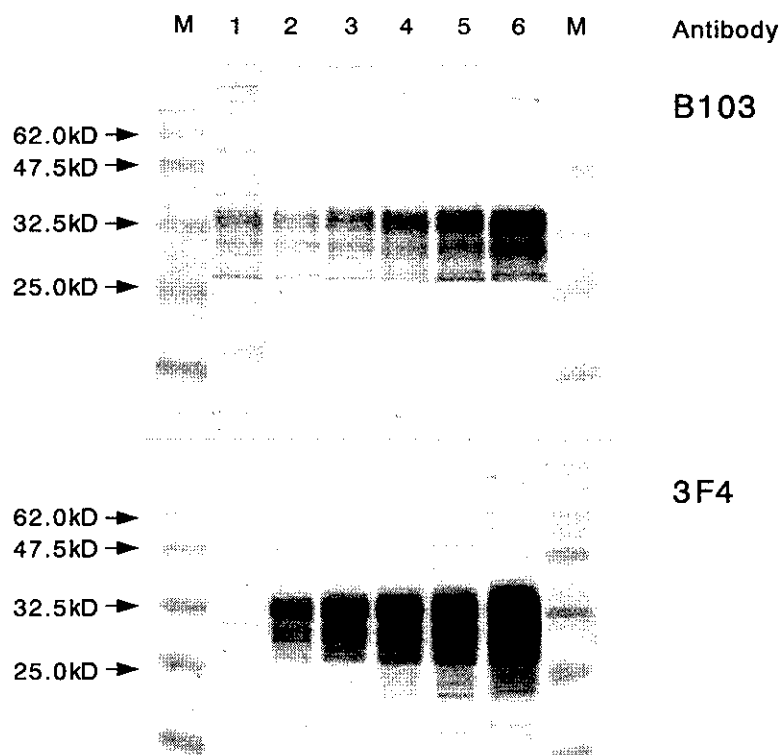


Fig 1 . Western blot analysis of Tg mice



Expression of PrP in brain tissue from NZW Prnp^{+/+} (1), transgenic hemizyote deficient for mouse PrP [Tg30^{+/-} · Prnp0/0] (2), PrP [Tg12^{+/-} · Prnp0/0](4), PrP [Tg21^{+/-} · Prnp0/0](5), PrP [Tg69^{+/-} · Prnp0/0](6) and transgenic homozygote deficient for mouse PrP [Tg30^{+/+} · Prnp0/0] (3) were estimated by Western blot analysis using anti-synthesized peptide bovine B103 which detected mouse and human PrP similarly and 3F4 monoclonal antibodies.
M:marker

変異型プリオン合成ペプチドによる PrP^{Sc} 生成の試み

班 員：金子 清俊（国立精神・神経センター・神経研・疾病第7部）

研究協力者：Stanley B. Prusiner(University of California, San Francisco)

Stephen J. DeArmond(University of California, San Francisco)

Michael A. Baldwin(University of California, San Francisco)

Fred E. Cohen(University of California, San Francisco)

〔研究要旨〕

人工的にスクレイビープリオン(PrP^{Sc})を生成するアプローチとして、アミノ酸変異を導入した合成プリオンペプチドを用いる方法がある。P101L 変異を導入したトランスジェニックマウスに、P101L 変異を持つマウス(Mo)89-143 に相当する合成ペプチドをβシート型に構造変換したものを投与したところ、20 匹中すべてのマウスがプリオン病を発症したが、βシート型に構造変換しなかったものは投与しても変化を惹起し得なかった。病理学的には、プリオン斑、海綿状変性、反応性グリオシスの所見を認めた。

A Synthetic Peptide Initiates Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) Disease in Transgenic Mice

Running title: A peptide causes Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease

Kiyotoshi Kaneko¹, Stanley B. Prusiner^{2,3}, Stephen J. DeArmond^{2,4}, Michael A. Baldwin⁵,
and Fred E. Cohen^{3,6,7,8}

¹National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Kodaira, Tokyo 187-8502 Japan,

²Institute for Neurodegenerative Diseases, Departments of Neurology, ³Biochemistry and Biophysics, ⁴Pathology,

⁵Pharmaceutical Chemistry, ⁶Cellular and Molecular Pharmacology, and ⁷Medicine, University of California,

San Francisco, CA 94143, USA.

ABSTRACT

The molecular basis of the infectious, inherited and sporadic forms of prion diseases is best explained by a conformationally dimorphic protein that can exist in distinct normal and disease-causing isoforms. We identified a 55-residue peptide of a mutant prion protein that can be refolded into at least two distinct conformations. When inoculated intracerebrally into the appropriate transgenic mouse host, 20 of 20 mice receiving the β-form of this peptide developed signs of central nervous system (CNS) dysfunction at ~360 days, with neurohistologic changes that are pathognomonic of Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) disease. By contrast, 8 of 8 mice receiving a non-β-form of the peptide failed to develop any neuropathologic changes more than 600 days after the peptide injections. We conclude that a chemically synthesized peptide refolded into the appropriate conformation can accelerate or possibly initiate prion disease.

〔はじめに〕

異常感染型プリオン(スクレイビープリオン; PrP^{Sc})は宿主ゲノムにコードされている正常プリオン

(PrP^C)のアイソフォーム型蛋白であるが、アミノ酸一次構造の差異は認められておらず、プロテアーゼ分解に対する部分抵抗性、界面活性剤への不溶性などにより両者は区別される。現在まで、その変換機構の詳細は解明されていないが、PrP^Cの β シート型構造が3%以下であるのに対しPrP^{Sc}では40%以上と著増しており、高次蛋白構造の変化がその背景にあると考えられている。近年の英国における狂牛病(牛プリオン病)の流行並びに人への伝播の可能性ともあいまって、その伝播機構解明の重要性は論を待たない。

In vitroにおけるプリオン蛋白の高次構造変換の試みは以前よりなされていたが、蛋白高次構造の変換には一般に高次細胞構築、シャペロン蛋白の補助が必要であることから成功の報告は認められていなかった。しかし、1994年Kociskoらにより、in vitroでPrP^CからPrP^{Sc}の主要な特徴の一つであるプロテアーゼ抵抗性を有するプリオン(プロテアーゼ抵抗性プリオン)への変換に成功したとの報告がなされた(1, 2)。その要旨は、いったんPrP^{Sc}を変性させプロテアーゼ感受性プリオンに変換した後、PrP^{Sc}構造に再度可逆的に変換する(renaturation)、その際PrP^Cを混ずることによりPrP^CがPrP^{Sc}同様プロテアーゼ抵抗性を獲得するとの報告である。我々も、同様の手法により、プリオン合成ペプチドを用いた検討を行ってきた。その結果、自然型のプリオン合成ペプチドを用いる限りにおいては、PrP^{Sc}の幾つの特徴を備えたいわゆるスクレイピー様プリオンへの変換は達成されたが、PrP^{Sc}の最終的なcriteriaである感染性の獲得には至らなかった(3, 4)。

今回我々は、突然変異を導入した変異型プリオン合成ペプチドを用い、人工的に感染性を有するPrP^{Sc}の作成を試みたので、その結果をここに報告する。

〔目的〕

プリオンの伝播に核酸が関与しないというprotein only theoryの最終的な証拠、およびスクレイピープリオン(PrP^{Sc})生成機構の解明を目的として、合成プリオンペプチドを用いてPrP^{Sc}を新たに生成する。

〔材料と方法〕

Applied Biosystems (div. Perkin Elmer, Foster City, CA) model 433A peptide synthesizer (0.25 mmol scale with Rink amide MBHA resin)を用い、Fmoc法によりP101L突然変異を導入した55残基のマウスプリオンペプチド(Mo89-143 P101L)を合成した後、50%アセトニトリルにて1週間処理を行い β シート型への高次構造の変換を行った(3, 4)。FTIRおよび電子顕微鏡により、 β シート構造およびファイバー形成を確認した。これらの処理の後に、1.5 mM濃度のペプチド30 μ lを右頭頂葉に摂取し、摂取後50日後から700日まで週2回ずつ経過観察を行った。

投与するペプチドと、宿主側のプリオン蛋白のシーケンスの相同性が重要であることから、宿主として、MoP101Lを低レベル発現するトランスジェニックマウスモデルとして既に確立されていたラインであるTg196 (MoPrPA P101L)(プリオン蛋白の発現レベルは1-2 X)を用いた。このラインは、自然経過において、生後600日を超えると20%程度のマウスにスクレイピー症状が発現してくることが知られている(図-1参照)。つまり、生後500日程度までを考えると、スクレイピー発症の閾値が極めて低い状態にあると考えられ、このラインはMo89-143 P101L変更に関するアッセイ系としては最もsensitiveであると考えた。

〔倫理面への配慮〕

トランスジェニックマウスの本実験への使用に関しては、UCSFの動物実験にかかわる倫理委員会の承認を経ている。また、脳を採取する際には、マウスに苦痛を与えないように、最大限の配慮を行った。

〔結果〕

P101L変異を導入したトランスジェニックマウス；Tg196(MoPrP-A P101L)に、同じ変異を持つマウ

スプリオン合成ペプチド MoPrP (89-143 P101L) を、シート型に構造変換したものを投与したところ、投与された 22 匹すべてのマウスがプリオン病を発症したが (潜伏期間 360±30 日)、βシート型に構造変換しなかったものは、同じ系統のトランスジェニックマウス 8 匹に投与しても全く変化を惹起し得なかったという成果を得た (図-1) (3)。病理学的には、プリオン斑、海綿状変性、反応性グリオシスの所見が認められ、ヒトのプリオン病の一種である Gerstmann-Sträussler-Scheinker 病 (GSS) と区別がつかない所見であった。また、ウエスタンブロットでは、P101L 変異を持つスクレイピープリオン (PrP^{Sc}) と同様に、proteinaseK 抵抗性を示す所見を認めなかった。現在、伝播実験中であるが、最新のデータでは、ほぼ同様の潜伏期間を経てスクレイピーが伝播され始めている。

〔考 察〕

我々の最終目標の一つは、プリオンの伝播に核酸が関与しないという *protein only theory* の最終的な証拠として合成ペプチドを用い PrP^{Sc} を新たに生成することにあり、以前より PrP^C に PrP^{Sc} 様物質の生成させることには成功していた (3, 4)。(1)日本人家族性患者においてヒト (Hu)PrP145 に *Amber mutation* が同定され (6)、(2)SHaPrP89 までは感染性獲得に不必要である、(3)PrP^C と PrP^{Sc} における抗原提示能の違いは主に N 末端側にある (7) 事実より、両者の高次構造上の差異は主に PrP90-144 内に存在することが推測され、我々はこの PrP90-144 (マウスにおいては 89-143) に相当する合成プリオンペプチドを用いて検討してきた。しかしながら、アミノ酸変異を有しない自然型ペプチドを用いた系では、現在までの所、新たな感染性が獲得された証拠は得られていない。おそらく、PrP^C の取り得るいくつかの反応中間体の高次構造の中で、特定の PrP^C 構造のみが PrP^{Sc} への変換を可能にするのであろうと我々は推測している。生体内では後述のプロテイン X がその PrP^C 中間体への変換を補助しているのであろう (8-10)。

人工的に PrP^{Sc} を生成する別のアプローチとして、アミノ酸変異を導入した合成プリオンペプチドを用いる方法がある。現在までに知られているヒトにおけるプリオン蛋白の突然変異の中に、トランスジェニックマウスに伝播可能なプリオン病を惹起するアミノ酸変異が複数存在する。これらの変異を導入した合成プリオンペプチドを用いた最新の成果として、ここに示したような結果が得られた。合成ペプチド投与によりトランスジェニックマウスに惹起されたプリオン病は、従来の潜伏期間とは全く異なる潜伏期間を持っている。すなわち新しい種であるということもできる。このことは、この結果が *contamination* などによるものである可能性を否定的に考えて良い根拠のひとつである。今後、アミノ酸変異を持たない自然型のプリオンペプチドに感染性を獲得させることができるかどうかを検討していく。この場合には、前述のプロテイン X の同定が鍵となることが予想されるため、その同定にむけて、現在鋭意努力中である。

〔結 論〕

βシート型に変換した変異型プリオン合成ペプチド (Mo89-143P101L) 投与により、トランスジェニックマウス (Tg196(MoPrP-A P101L)) にプリオン病を惹起することに成功した。

〔参考文献〕

- 1) Kocisko, D. A., Come, J. H., Priola, S. A., Chesebro, B., Raymond, G. J., Lansbury, P. T., Jr. & Caughey, B. Cell-free formation of protease-resistant prion protein *Nature* 370, 471-474, 1994
- 2) Kocisko, D. A., Priola, S. A., Raymond, G. J., Chesebro, B., Lansbury, P. T., Jr. & Caughey, B. Species specificity in the cell-free conversion of prion protein to protease-resistant forms: a model for the scrapie species barrier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3923-3927, 1995.
- 3) Kaneko, K., Peretz, D., Pan, K. M., Blochberger, T. C., Wille, H., Gabizon, R., Griffith, O. H., Cohen, F. E., Baldwin, M. A. & Prusiner, S. B. Prion protein (PrP) synthetic peptides induce cellular PrP to acquire properties of the scrapie isoform *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 11160-4, 1995.

- 4) Kaneko, K., Wille, H., Mehlhorn, I., Zhang, H., Ball, H., Cohen, F. E., Baldwin, M. A. & Prusiner, S. B. Molecular properties of complexes formed between the prion protein and synthetic peptides, *J. Mol. Biol.* 270, 574-86,1997.
- 5) Kaneko, K., Ball, H. L., Wille, H., Zhang, H., Groth, D., Torchia, M., Tremblay, P., Safar, J., Prusiner, S. B., DeArmond, S. J., Baldwin, M. A. & Cohen, F. E. : A Synthetic Peptide Initiates Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) Disease in Transgenic Mice *J. Mol. Biol.*, in press.2000
- 6) Kitamoto, T., Iizuka, R. & Tateishi, J. : An amber mutation of prion protein in Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome with mutant PrP plaques, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192, 525-531,1993.
- 7) Peretz, D., Williamson, R. A., Matsunaga, Y., Serban, H., Pinilla, C., Bastidas, R. B., Rozenshteyn, R., James, T. L., Houghten, R. A., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. & Burton, D. R. : A conformational transition at the N-terminus of the prion protein features in formation of the scrapie isoform, *J. Mol. Biol.* 273, 614-622,1997.
- 8) Telling, G. C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F. E., DeArmond, S. J. & Prusiner, S. B. Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein, *Cell* 83, 79-90,1995.
- 9) Kaneko, K., Zulianello, L., Scott, M., Cooper, C. M., Wallace, A. C., James, T. L., Cohen, F. E. & Prusiner, S. B. : Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10069-74,1997.
- 10) Zulianello, L., Kaneko, K., Scott, M., Han, D., Pilkuhn, S., Cohen, F. E. & Prusiner, S. B. Participation of the N-terminal domain of PrP in binding to protein X, *J. Virol.*, in press.2000

〔研究発表〕

1.論文発表

- 1) S. B. Prusiner, P. Peters, K. Kaneko, A. Taraboulos, V. Lingappa, F. E. Cohen, and S. J. DeArmond. Chapter 9; Cell Biology of Prions. *Prion Biology and Diseases* (S. B. Prusiner ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, (Cold Spring Harbor, New York) 1999, p349-391.
- 2) S. B. Prusiner, K. Kaneko, F. E. Cohen, J. Safar and D. Riesner. Chapter 15; Some Strategies and Methods for the Study of Prions. *Prion Biology and Diseases* (S. B. Prusiner ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, (Cold Spring Harbor, New York) 1999, 653-715.
- 3) K. Kaneko, H. L. Ball, H. Wille, H. Zhang, D. Groth, M. Torchia, P. Tremblay, J. Safar, S. B. Prusiner, S. J. DeArmond, M. A. Baldwin, and F. E. Cohen. A Synthetic Peptide Initiates Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) Disease in Transgenic Mice. Running title: A peptide causes Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease. *J. Mol. Biol.*, in press.
- 4) L. Zulianello, K. Kaneko, M. Scott, S. Erpel, D. Han, F. E. Cohen, and S.B. Prusiner. N-terminal mutations modify a C-terminal epitope of the prion protein that binds to protein X. *J. Virol.*, in press.
- 5) C. Korth, K. Kaneko, and S. B. Prusiner. Expression of unglycosylated mutant prion protein facilitates conversion into PrP^{Sc} by different strains of mouse prions in neuroblastoma cells. *J. Gen. Virology*, in submission.
- 6) V. Perrier, A. Wallace, K. Kaneko, J. Safar, S. B. Prusiner, and F. E. Cohen. Mimicking dominant negative inhibition of prion replication through structure-based drug design. *Science* in submission

2.学会発表

- 1) C. Korth, K. Kaneko, S. B. Prusiner. Expression of underglycosylated mutant prion protein facilitates conversion into PrP^{Sc} by three different strains of mouse prions in neuroblastoma cells. International Symposium - Characterization and Diagnosis of Prion Diseases in Animals and Man. September 23-25, 1999. Tübingen, Germany.

- 2) 金子清俊. 異常プリオン蛋白複製への新たな参加者－ Protein X － . The 36th Annual Meeting of Japanese Biochemical Society. Yokohama, Japan, October 6-9, 1999
- 3) 金子清俊. 異常プリオン蛋白複製への新たな参加者－ Protein X － . Niigata Symposium. Niigata, Japan, November 13, 1999

〔知的財産所有権〕

1.特許取得

1 U.S. patent application serial NO. 08/556,823 and corresponding PCT application US 96/17462
(U.C. case NO. 96-091-1)

2 Prion Protein Modulator factor (PPMF) and prion resistant animals (U.C. Reference NO. 97-283-1)

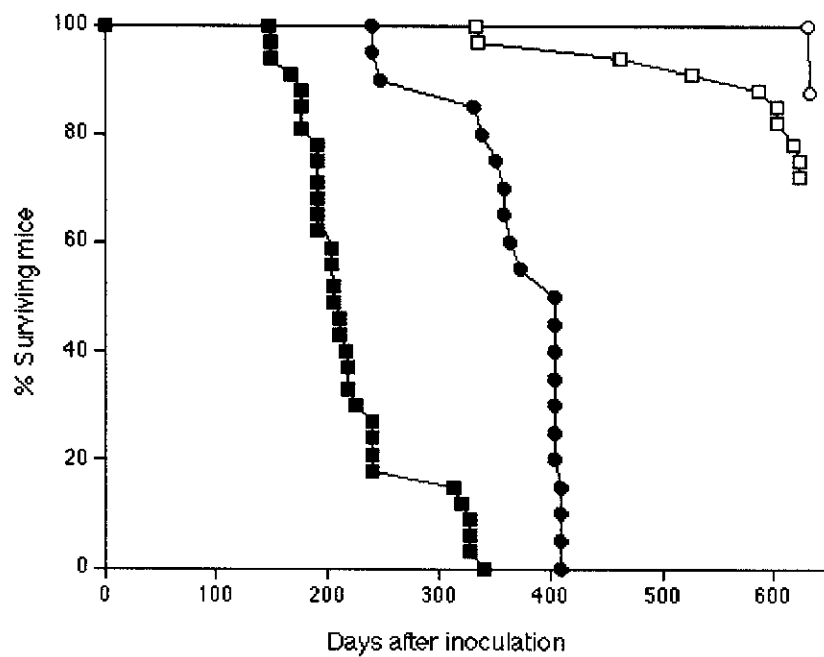


図-1 : Tg(MoPrP-A P101L)196 mice に合成プリオンペプチド MoPrP (89-143 P101L) を投与した結果。βシート型のみがプリオン病を惹起した。■ : この突然変異をもつ PrP を大量に発現し、プリオン病を自然発症した別系統のマウス脳を摂取した場合。● : βシート型ペプチドを投与した場合。□ : 何も投与しない場合。○ : 非βシート型ペプチドを投与した場合。

脳外傷および脳血液関門の破綻によるプリオン病発症への影響

班 員：堂浦 克美（九大・医・脳研病理）

研究協力者：古川 ひさ子、岩城 徹（九大・医・脳研病理）

〔研究要旨〕

プリオン病病原因子が標的臓器である中枢神経系へ到達する機序に関しては不明である。しかし、血液中に感染因子が存在することより、一過性に脳外傷や脳血液関門の破綻が中枢神経系病変の発生に関与する可能性が考えられる。そこで、腹腔内に病原因子を接種したマウスに脳外傷・血液脳関門の破綻を一過性に加え、中枢神経系病変の発生および臨床・病理像が修飾されるかどうかを検討した。その結果、病原因子を腹腔内投与後に中枢神経系病変発生までのいかなる時期に一過性に脳外傷を加えても、発症までの期間・臨床症状・病理所見に変化が見られないことが明かとなった。このことは、一過性の脳外傷・血液脳関門の破綻だけでは中枢神経系病変を修飾するのに十分でないということを示すだけでなく、病原因子の中枢神経系への伝播経路として血液を介するよりもより効率的な経路が存在することを示している。

Influence of transient brain injury and blood-brain barrier damage on the neuroinvasion in prion diseases

Katsumi DOH-URA, Hisako FURUKAWA, Toru IWAKI

Department of Neuropathology, Neurological Institute, Kyushu University

ABSTRACT

The pathogenesis of neuroinvasion in prion diseases following the peripheral uptake of a disease agent is still not fully understood. The possibility of neuroinvasion either being established or being accelerated by an insult to the brain has not previously been tested. The experiment described herein was designed to examine this possibility by wounding the brain following an intraperitoneal challenge with a mouse-adapted strain of human prion disease, Fukuoka-1 strain. The results showed that brain injury introduced in any period before the appearance of cerebral abnormal prion protein deposition modified neither the clinical features, the incubation period, nor the histopathology of the mice. Our findings suggest that neurovirulence of the agent may not be sufficiently promoted by brain injury and that the neuroinvasion may be mainly administered by the pathway(s) other than the route through the blood stream.

〔はじめに〕

プリオン病は中枢神経系の選択的な変性により発症するが、プリオン病の感染性は中枢神経系だけでなく一般臓器や組織、特にリンパ組織に認められる。一般的にプリオン病の感染因子は経口、腹腔内に摂取された後に、まずリンパ組織で増幅し中枢神経系に到達すると考えられている。この中枢神経系への侵入口に関しては交感神経を介して胸髄や、あるいは副交感神経を介して脳幹部に入ることが推定されている。一方では感染因子が血液中に存在することも指摘されており、遺伝子改変マウスの研究から B リンパ球が中枢神経病変の発生に必要であることが報告されている。このことは血液を介して中枢神経系に感染因子が運ばれる可能性があること示している。一方、本邦ではヒト乾燥硬

膜を用いた脳外科手術症例にプリオン病が多発している。これらの患者において脳腫瘍などの原因疾患や手術に伴う一過性の脳外傷や血液脳関門の破綻が、プリオン病の発症を速めるなどプリオン病の脳病変を修飾した可能性については明らかにされていない。

そこで、我々は脳外傷や血液脳関門の破綻がプリオン病の脳病変の進行を修飾しないかどうかを動物モデルを用いて検討した(1)。

〔材料および方法〕

感染因子・動物 マウス順化プリオン病病原因子株である福岡 1 株の 1%脳乳剤 10ul を NZW マウスの脳内に、あるいは 100ul を腹腔内に接種した。

臨床症状・病理所見の検討 接種後、1 日あるいは 2 日おきにマウスを観察した。2 週または 4 週毎にマウスを屠殺し、脳と脾臓を取り出しホルマリン固定した。脳病変の有無を HE 染色および GFAP 免疫染色で検討した。また、脾臓・脳内の異常プリオン蛋白沈着を PrP 免疫染色で検討した。

脳外傷の作成 腹腔内接種マウスにおいて、接種後 0, 4, 8, 12, 16 週後に脳内に生食あるいは正常マウス脳乳剤 20ul を注入し一過性の脳外傷・血液脳関門破綻モデルを作成した。陽性対照として、腹腔内接種マウスに上記と同様に脳内に福岡 1 株の 1%脳乳剤を投与した。これらの処置を行ったマウスを 1 日あるいは 2 日おきに臨床症状の有無を観察した。また、腹腔内接種 20 週と臨床末期に屠殺し上記のごとく病理所見を検討した。

（倫理面への配慮）

動物実験は、動物実験委員会の指針の範囲内で行われた。

〔結果〕

脳内接種マウスと腹腔内接種マウスの病理・臨床所見

脳内接種マウスでは接種後 8~10 週で脳内に海綿状変化と異常プリオン蛋白沈着が出現し、18 週頃には死亡した。一方、腹腔内接種マウスでは 16~20 週で脳内に海綿状変化と異常プリオン蛋白沈着が見られ、34 週頃に死亡した。脳内で最初に海綿状変化や異常プリオン蛋白の沈着が見られたのは視床の neuropil であった。脳内接種マウスと腹腔内接種マウスでは、病変に 2 つの違いが見られた。一つは、大脳皮質と海馬に挟まれた大脳白質の病変（海綿状変化と異常プリオン蛋白沈着）が脳内接種マウスでは早期より目立った。さらに、海綿状変化や異常プリオン蛋白沈着などの脳病変の程度が脳内接種マウスでより顕著であった。

臨床所見では罹患マウスは不活発化、毛並みの劣化、体重減少、猫背、全身痙攣、固縮、運動性低下、後肢麻痺、失調運動などを示した。脳内接種マウスでは、全例で不活発化と毛並みの劣化が目立ったが、腹腔内接種マウスでは半数以上のもので後肢麻痺と失調運動症状が優位であった。

脳外傷の影響

腹腔内接種マウスにおいて、接種後 0, 4, 8, 12, 16 週に脳内に生食あるいは正常マウス脳乳剤を注入した一過性脳外傷・血液脳関門破綻モデルでは、接種後 0 週に外傷を与えたモデル群は対照に比し潜伏期間の短縮が見られた（生食によるモデルで 19 日の短縮($p<0.05$)、脳乳剤によるモデルで 23 日の短縮($p<0.01$)）。しかし、その他のモデル群の潜伏期間は外傷を与えていない対照の潜伏期間と差違が見られなかった（表 1）。

一方、一過性脳外傷・血液脳関門破綻モデル群の臨床症状は、外傷を導入した時期に関わらず、外傷を与えていない対照と同様に後肢麻痺と失調運動が症状の前景となっており、その比率においても差違が見られなかった（表 2）。

さらに、これらのモデルの腹腔内接種後 20 週と臨床末期の病理所見を対照のものと比較した結果のうち、潜伏期間で差の見られた接種後 0 週のを表 3 にまとめている。一過性脳外傷・血液脳関門破綻を起こしたものでも、その病理所見は対照のものと同様であった。また、この結果は接種後 0 週だけでなく外傷を導入した時期に関わらず同様であった。

ところで、生食や正常脳乳剤を脳内注入する代わりに福岡 1 株脳乳剤を脳内注入した陽性対照では、腹腔内の感染因子の存在如何に関わらず、脳内接種群と同様の潜伏期間、臨床所見、病理所見を示した。また、腹腔内接種後 16 週に福岡 1 株脳乳剤を脳内注入したマウス群の潜伏期間は、外傷を与えていない腹腔内接種対照群の潜伏期間とほぼ一致するにもかかわらず、すべてのマウスは脳内接種マウスの病理・臨床所見を呈し、腹腔内接種マウスと同じ病理・臨床所見を呈するものはなかった（表 3）。

〔考 察〕

一過性脳外傷・血液脳関門破綻によるプリオン病発症への影響をみた実験により、病原因子を腹腔内投与後に、中枢神経系病変発生までのいかなる時期に一過性の脳外傷・血液脳関門の破綻を与えても、発症までの期間・臨床症状・病理所見に変化が見られないことが明かとなった。このことは、脳外傷・血液脳関門の破綻を一過性に加えただけでは中枢神経系病変の発生を修飾するのに十分でないということを示すだけでなく、病原因子の中枢神経系への伝播経路として血液や血球細胞を介する経路よりもより効率的な経路が存在することを示している。

一方、脳内接種マウスと腹腔内接種マウスの病理・臨床所見の比較により、それぞれのマウスで特徴的な所見が見られることが明かとなった。脳内接種マウスでは、皮質下白質の病変が早期より出現し、脳病変の程度は腹腔内接種マウスより高度であった。マウスは毛並みの劣化、体重減少、固縮、運動性低下を示したが、これらは大脳の広範な機能障害にもとずくと解釈できる。一方、腹腔内接種マウスでは脳病変は脳内接種マウスより軽く、行動異常として半数以上のマウスで後肢麻痺を示した。この責任病巣としては胸髄以下の脊髄が考えられ、同部位が中枢神経系侵入への入口となっている可能性がある。このことは、Kimberlin ら(2-4)の報告と矛盾しない。この伝播経路として交感神経を介して胸髄に侵入する可能性は十分に推定できる。また、Beekes ら(5)が示唆しているように副交感神経を介して脳幹部に侵入する可能性もあり、これらが主要な侵入経路であるかどうかを検証し、またどのような機構によって運ばれるのかを明らかにする必要がある。

最後に、血液を介し血液脳関門の破綻により中枢神経系へ感染因子が伝播するかどうかについては、本研究で用いた実験系では明らかにし得ない。血液以外の伝播経路が機能しないような実験系、例えば PrP ノックアウトマウスを応用するなどの工夫が必要であると考えられ、今後の課題である。

〔文 献〕

- 1) Doh-ura K, Mohri S, Tashiro H, Kawashima T, Kikuchi H, Iwaki T.: Brain injury does not modify transmissible spongiform encephalopathy caused by intraperitoneal inoculation with Fukuoka-1 strain. *J. Gen. Virol.*, 80:1551-6, 1999
- 2) Kimberlin RH, Walker CA. : Pathogenesis of mouse scrapie: dynamics of agent replication in spleen, spinal cord and brain after infection by different routes. *J. Comp. Pathol.*, 89:551-62, 1979.
- 3) Kimberlin RH, Walker CA.: Pathogenesis of scrapie (strain 263K) in hamsters infected intracerebrally, intraperitoneally or intraocularly. *J. Gen. Virol.*, 67:255-63, 1986.
- 4) Kimberlin RH, Walker CA. : Pathogenesis of scrapie in mice after intragastric infection. *Virus Res.*, 12:213-20, 1989.
- 5) Beekes M, McBride PA, Baldauf E. : Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *J. Gen. Virol.*, 79:601-7, 1998.

〔研究発表〕

1. 論文発表

- 1) Kawashima T., Doh-ura K., Iwaki T.(1999) Argyrophilic grains in late-onset Creutzfeldt-Jakob diseased brain. *Pathology International*, 49: 369-373

- 2) Kawashima T., Adachi T., Tokunaga Y., Furuta A., Suzuki O.S., Doh-ura K., Iwaki T.(1999) Immunohistochemical analysis in a case of idiopathic Lennox-Gastaut syndrome. *Clin. Neuropathol.*, 18: 286-292
- 3) Doh-ura K., Mohri S., Tashiro H., Kawashima T., Kikuchi H., Iwaki T.(1999) Brain injury does not modify transmissible spongiform encephalopathy caused by intraperitoneal inoculation with Fukuoka-1 strain. *J. Gen. Virol.*, 80: 1551-1556
- 4) Kikuchi H., Doh-ura K., Kira J., Iwaki T.(1999) Preferential neurodegeneration in the cervical spinal cord of progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol.*, 97: 577-584
- 5) Kikuchi M., Doh-ura K., Kawashima T., Kira J., Iwaki T.(1999) Immunohistochemical analysis of spinal cord lesions in amyotrophic lateral sclerosis using microtubule associated protein 2(MAP2) antibodies. *Acta Neuropathol.*, 97: 13-21
- 6) Kawashima T., Doh-ura K., Torishu M., Uchida Y., Furuta A., Iwaki T. (1999) Differential expression of methallothionein in human prion diseases. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, in press
- 7) Kawashima T., Furuta A., Doh-ura K., Kikuchi H., Iwaki T. (1999) Ubiquitin-immunoreactive skein like inclusions in the neostriatum are not restricted to amyotrophic lateral sclerosis, but are rather aging-related structures. *Acta Neuropathol.*, in press
- 8) Kawashima M., Suzuki S.O., Doh-ura K., Iwaki T. (1999) α -Synuclein is expressed in a variety of brain tumors showing neuronal differentiation. *Acta Neuropathol.*, in press
- 9) 川島敏郎, 堂浦克美(1999) クロイツフェルト・ヤコブ病. *精神科治療学*, 14: 95-100
- 10) 古川ひさ子, 堂浦克美(1999) プリオン病. *臨床検査*, 43: 567-572
- 11) 田代博史, 堂浦克美(1999) プリオン病. *カレントセラピー*, 17: 122-125
- 12) 菊池仁志, 河野祐治, 堂浦克美, 河村忠雄, 谷脇孝恭, 山田 猛, 加藤元博, 岩城 徹, 吉良潤一(1999) 一過性に抗 GM1 抗体陽性となり γ -グロブリン静注療法にて電気生理学的所見に改善が見られた下位運動ニューロン疾患の男性例. *BRAIN and NERVE*, 51: 455-464
- 13) 堂浦克美(1999) 痙性対麻痺と特異な形態の老人斑を有するプレセニリン 1 第 9 エクソン欠失を伴う家族性アルツハイマー病. *Medical Briefs in Brain & Nerve*, 19:11-12
- 14) 堂浦克美(1999) プリオン病研究とプリオン仮説の行方. *実験医学*, 17:503-509
- 15) 堂浦克美(1999) プリオン病 Creutzfeldt-Jakob 病と(Gerstmann-Sträussler-Scheinker 症候群). *化学療法の領域*, 14:5-9
- 16) 堂浦克美(1999) Gerstmann-Sträussler-Scheinker 症候群. *Clinical Neuroscience* 17:112
- 17) 堂浦克美(1999) プリオン病—コンフォメーション病の代表的疾患. *別冊医学のあゆみ*, Ver1:510-513

2. 学会発表

- 1) 堂浦克美(1999) 感染型プリオン蛋白の形成及び安定性に影響する因子. 第 26 回日本脳科学会総会
- 2) 堂浦克美, 目加田英輔, 岩城徹(1999) ヒトおよびマウス CJD 脳における CD9 の発現増加. 第 40 回日本神経病理学会
- 3) 菊池仁志, 堂浦克美, 吉良潤一, 岩城徹(1999) 進行性核上性麻痺における脊髄病変の検討. 第 40 回日本神経病理学会
- 4) 川島敏郎, 堂浦克美, 岩城徹(1999) 高齢発症クロイツフェルト・ヤコブ病における argyrophilic grain の出現頻度. 第 40 回日本神経病理学会

Table 1. Incubation periods

Interval in weeks	Injection	No. affected / no. inoculated	Incubation period in days (mean±s.e.)	
ic-control		8/8	127±2.0	
ip-control		11/11	242±17.6	
0	saline	7/7	223±18.8 *	
	n.b.h.	7/7	219±10.1 **	
4	Fu-1	6/6	127±2.9 †	155±2.9 ‡
	saline	6/6	238±13.4	
	n.b.h.	6/6	251±26.4	
8	Fu-1	6/6	128±1.1 †	184±1.1 ‡
	saline	6/6	246±12.3	
	n.b.h.	6/6	241±16.1	
12	Fu-1	6/6	128±3.2 †	212±3.2 ‡
	saline	5/5	231±29.3	
	n.b.h.	6/6	237±22.9	
16	Fu-1	5/5	125±4.8 †	237±4.8 ‡
	saline	6/6	251±16.7	
	n.b.h.	6/6	238±24.7	

n.b.h., normal brain homogenate; Fu-1, Fukuoka-1-infected brain homogenate.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

† interval from ic-injection, ‡ interval from ip-inoculation.

Table 2. Clinical sings

Interval in weeks	Injection	No. affected	Paraplegia / Reduced vividness
ic-control		8	0 / 8
ip-control		11	6 / 5
0	saline	7	4 / 3
	n.b.h.	7	4 / 3
4	Fu-1	6	0 / 6
	saline	6	4 / 2
	n.b.h.	6	3 / 3
8	Fu-1	6	0 / 6
	saline	6	2 / 4
	n.b.h.	6	3 / 3
12	Fu-1	6	0 / 6
	saline	5	4 / 1
	n.b.h.	6	4 / 2
16	Fu-1	5	0 / 5
	saline	6	4 / 2
	n.b.h.	6	4 / 2

n.b.h., normal brain homogenate; Fu-1, Fukuoka-1-infected brain homogenate.

Table 3. Summary of the histopathology

Brain region	ip		Control		Ic-injected at 0 week		Ic-injected at 16 weeks	
	T.S.	20 w.	T.S.	8 w.	saline	post-ip-inoculation	n.b.h.	post-ip-inoculation
	Vc./PrP	Vc./PrP	Vc./PrP	Vc./PrP	Vc./PrP	Vc./PrP	Vc./PrP	Vc./PrP
Cerebellum	4+/3+	±/±	4+/3+	-/-	4+/3+	±/±	4+/3+	4+/3+
Pons	4+/3+	±/±	4+/3+	-/-	4+/3+	±/±	4+/3+	4+/3+
Cortex	2+/2+	-/-	3+/3+	-/-	1+/2+	-/-	2+/2+	3+/3+
White matter								
Cerebral*	1+/1+	-/-	3+/3+	1+/1+	1+/1+	1+/1+	1+/1+	3+/3+
Internal capsule	3+/2+	±/1+	4+/4+	1+/1+	2+/2+	±/±	3+/2+	4+/4+
Hippocampus	1+/2+	-/-	2+/3+	±/±	1+/2+	-/-	1+/2+	3+/3+
Thalamus	2+/3+	-/1+	3+/4+	±/1+	2+/3+	-/1+	2+/3+	4+/4+
Basal ganglia	2+/2+	-/-	2+/2+	-/-	2+/2+	-/-	2+/2+	2+/2+
Hypothalamus	1+/1+	-/-	2+/2+	-/-	1+/1+	-/-	1+/1+	2+/2+

The key to scoring is as follows: -, no vacuolation/PrP signal; ±, one or two vacuoles per field or very faint PrP deposition; +, mild vacuolation/PrP deposition; ++, moderate vacuolation/PrP deposition; +++, marked vacuolation/PrP deposition; +++++, huge vacuolation/PrP deposition. *, white matter between the cortex and hippocampus. n.b.h., normal brain homogenate; Fu-1, Fukuoka-1-infected brain homogenate; T.S., terminal stage; 20 w., 20 weeks post-ip-inoculation; 8 w., 8 weeks post-ic-inoculation; Vc., vacuolation.

プリオン蛋白類似蛋白 (PrPLP) の同定

班 員：片峰 茂 (長崎大学・医学部・細菌学)
研究協力者：李 愛民 (長崎大学・医学部・細菌学)
坂口 末廣 (長崎大学・医学部・細菌学)
新 竜一郎 (長崎大学・医学部・細菌学)
Bhabesh C. Roy (長崎大学・医学部・細菌学)
中桶 了太 (長崎大学・医学部・細菌学)
有馬 和彦 (長崎大学・医学部・細菌学)
重松 和人 (長崎大学・医学部・第2病理)

[研究要旨]

これまで報告されている4系統のPrP遺伝子欠損マウスのうち、2系統のみが小脳プルキンエ細胞の変性脱落を呈した。最近我々は、PrP類似蛋白(PrPLP)をコードする新規遺伝子をPrP遺伝子の下流に同定した。正常マウス脳でのPrPLP遺伝子の発現は、生後6日に最大であり、その後減少し8週には検出できなくなった。また、*in situ* hybridizationと免疫組織化学法にて脳血管内皮細胞に発現していることが分かった。しかし、プルキンエ細胞脱落を呈する欠損マウス脳では、PrP遺伝子エクソン1/2とPrPLP遺伝子との間で遺伝子間スプライシングが起こり、PrPLPはPrP遺伝子プロモーターによって発現調節を受け過剰に発現し、さらにプルキンエ細胞をはじめほとんど全ての神経細胞に異所性に発現していた。これらの結果は、PrPLPの過剰発現または異所性発現がプルキンエ細胞の変性脱落に関与していることを示唆した。

Identification of the gene encoding a prion protein-like protein, PrPLP

Shigeru KATAMINE¹⁾, Aimin LI¹⁾, Suchiro SAKAGUCHI¹⁾, Ryuichiro ATARASHI¹⁾,
Bhabesh C. ROY¹⁾, Ryota NAKAOKE¹⁾, Kazuhiko ARIMA¹⁾, Kazuto SHIGEMATSU²⁾

¹⁾Department of Bacteriology and ²⁾The Second Department of Pathology,
Nagasaki University School of Medicine

ABSTRACT

Two out of the so far reported four lines of PrP-deficient mice displayed ataxia due to Purkinje cell degeneration, whereas the others did not. Recently we identified a novel gene encoding PrP-like protein, PrPLP. In the brain of wild-type mice, the PrPLP expression was the highest at 6 days after birth and then decreased gradually to an undetectable level by 8 weeks. Moreover, the analyses using *in situ* hybridization and immunohistochemistry revealed that PrPLP was expressed preferentially in endothelial cells, but not in neurons. In contrast, in the brain of ataxic PrP-deficient mice, the PrPLP open reading frame was transcribed as chimeric mRNA with PrP exon 1 and 2 by intergenic splicing mechanisms, thereby being regulated under the control of PrP promoter and expressed ectopically in nearly all neurons including Purkinje cells. These results suggest that the ectopic and upregulated expression of PrPLP could be associated with the Purkinje cell degeneration in the ataxic mice.

〔はじめに〕

プリオン蛋白 (PrP) はプリオン病 (伝達性海綿状脳症) に深く関与する宿主蛋白であるが、その生理学的機能はまだ十分に解明されていない。そこで、PrP 遺伝子欠損 (*Prnp^{0/0}*) マウスが作製され、PrP の機能解析が行われた。奇妙なことに、これまで報告されている 4 系統の PrP 遺伝子欠損マウスのうち、当研究室で作製されたマウス (*Ngsk Prnp^{0/0}*) を含め 2 系統のみが、老齢になると小脳プルキンエ細胞の変性脱落による小脳機能障害を呈した^{1,2)}。他の 2 系統のマウス (*Zrch Prnp^{0/0}* 及び *Edbg Prnp^{0/0}*) には何ら異常は認められなかった^{3,4)}。現在のところ、このような異なる表現型を呈する分子機構は不明であるが、欠損マウス作製時に用いたターゲットベクターの違いに起因すると考えられる。異常を呈した 2 系統マウスのベクターは、PrP 遺伝子エクソン 3 のスプライシングアクセプター部位を欠いていた。このことは、異常を呈した 2 系統マウスの PrP 遺伝子座で何らかのスプライシング異常が生来され、それによってプルキンエ細胞の変性脱落に関与する PrP 以外の遺伝子に何らかの異常を来しているのではないかと示唆した。この可能性を検討した結果、驚くことに、*Ngsk Prnp^{0/0}* マウスの脳では実際にスプライシングの異常があり、それによって PrP 遺伝子の下流に存在する PrP 類似蛋白 (PrPLP) をコードする遺伝子が特異的に過剰発現していることが明らかになった⁵⁾。正常マウス脳では新生児期のみ PrPLP の発現は認められ、その発現は血管内皮細胞のみに局限していた⁵⁾。しかし、*Ngsk Prnp^{0/0}* マウス脳では PrPLP は構成的に発現し、さらに小脳プルキンエ細胞をはじめとした多くの神経細胞に異所性に発現していた⁵⁾。これらの結果は、PrPLP の異所性または過剰発現が *Ngsk Prnp^{0/0}* マウスの小脳プルキンエ細胞変性死に関与していることを示唆した。

〔材料と方法〕

1) マウス脳からの RNA 抽出

マウスは、エーテル麻酔下のもと頸椎脱臼法にて安楽死を行い、その後脳を摘出した。RNA の抽出は TRIZOL 試薬 (GibcoBRL Life Technologies, Inc.) を用いて行った。

2) ノーザンブロットング法

RNA を変性アガロースゲルにて電気泳動後、Hybond N メンブレン (Amersham) に 10×SSC を用いてトランスファーした。プレハイブリダイゼーションはハイブリダイゼーション緩衝液 (50% フォルマミド、5×SSPE、5×デンハルト液、0.5% SDS、10% 硫酸デキストラン、100 μg/ml salmon sperm DNA) 中にて 45 °C で数時間行い、ハイブリダイゼーションは ³²P 標識プローブ (BcaBEST Labelling Kit, TaKaRa) にて上記条件で一昼夜行った。洗いは、2×SSC / 0.1% SDS で室温 10 分を 2 回、1×SSC / 0.1% SDS で 65 °C 15 分を 1 回、さらに 0.1×SSC / 0.1 % SDS で 65 °C 15 分を 2 回行った。シグナルは、BAS2000 (Fuji) を用いるか、X 線フィルム (Konica) に感光するかによって検出した。

3) 5' および 3' Rapid amplification of cDNA ends (RACE)

5' および 3' RACE system (GibcoBRL Life Technologies, Inc.) を用いて、プロトコールに従って行った。5' RACE 用のプライマーとして PrP エクソン 1 センスプライマー 501 (5'-GTCGGATCAGCAGACCGATTCT-3') を、3' RACE 用のプライマーとして PrPLP 遺伝子アンチセンスプライマー 333 (5'-AGCATCTCCTTGGTCACGTTGGC-3') を用いた。得られた DNA 断片は pPCR2.1 TOPO (Invitrogen) または pBluescript KSII (-) にクローニングし、Texas Red T3, T7, または reverse M13 Primer (Amersham) と Thermo Sequenase pre-mixed cycle sequencing kit (Amersham) を用いて塩基配列決定を行った。

4) *In situ* hybridization 法

脳組織を 4% パラフォルムアルデヒドにて固定した後、5 μm 厚の切片を作成した。脱パラ後、8 mg/ml ペプシンで 37 °C 10 分処理し、ハイブリダイゼーション (50% フォルマミド、10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.6 M NaCl, 0.5 mg/ml yeast tRNA, 0.25 mg/ml salmon sperm DNA, 1% skim milk, 0.25% SDS, 5×デンハルト液) を 50 °C 16 時間行った。cRNA プローブはジゴキシゲニン-UTP (Boehringer Mannheim Biochem.) でラベルした。洗いは、4×SSC で数回行い、50% フォルマミド / 2×SSC で 50 °C 30 分行った。さらに、20 μg/ml RNase A で 37 °C 30 分処理し、0.2×SSC で 60 °C 20 分洗浄した。シグナルは

アルカリフォスファターゼ抱合抗ジゴキシゲニン抗体で検出した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、動物実験委員会の指針の範囲内で行われた。

〔結 果〕

まず、*Ngsk Prnp^{0/0}* マウスの PrP 遺伝子座でスプライシング異常が起っているのかどうかを、正常、*Ngsk Prnp^{0/0}*、および *Zrch Prnp^{0/0}* マウスの脳より RNA を抽出し、PrP エクソン 1/2 とエクソン 3cDNA をプローブとしてノーザンブロッティングを行い検討した (図 1 a)。その結果、正常マウス脳では 2.2kb の PrP mRNA が、両方のプローブにて検出された。しかし驚くことに、*Ngsk Prnp^{0/0}* マウスでは、エクソン 1/2 プローブのみにハイブリダイズする 2.2 と 3.4kb の mRNA が検出された。また、*Zrch Prnp^{0/0}* マウスでは、既に報告されているように PrP とネオマイシン耐性遺伝子との 2.4kb のキメラ mRNA が検出されたが、上記のような 2.2 と 3.4kb の異常な mRNA は検出されなかった。次に、5' および 3'RACE にてこれらの異常 mRNA の全長 cDNA をクローニングし、塩基配列を決定した。その結果、これらの mRNA は 5' 末端側に PrP エクソン 1/2 の塩基配列を有し、それに続いてアミノ酸一次構造が PrP と高い類似性を示す 179 個のアミノ酸から成る糖蛋白 (PrP 類似蛋白、PrPLP、図 1 b) をコードする領域を有するキメラ mRNA であることが明かとなった。さらに、これらの mRNA は alternative splicing により産生されることが明かとなった。これらの結果は、*Ngsk Prnp^{0/0}* マウスの PrP 遺伝子座で PrP 遺伝子と PrPLP 遺伝子との間で遺伝子間スプライシングが起っていることを示した。

正常マウス脳での PrPLP の発現をノーザンブロット法にて検討した。図 2a に示すように、正常脳では生直後から PrPLP の発現が認められるが、生後 6 日にそのピークを迎え、その後減少し 8 週には検出できなくなった (未発表)。in situ hybridization と免疫組織化学法にて脳血管内皮細胞に発現していることが分かった (data not shown、未発表)。しかし、*Ngsk Prnp^{0/0}* マウス脳では PrPLP の発現は、生後減少することなく構成的に発現し、8 週でも高い発現が認められ (図 2b、未発表)、in situ hybridization にて、プルキンエ細胞や海馬領域の錐体細胞をはじめほとんど全ての神経細胞に異所性発現が認められた (図 3)。

〔考 察〕

今回我々は、PrP と高い類似性を示す蛋白をコードする新規遺伝子、PrPLP 遺伝子を同定した⁵⁾。正常マウス脳での PrPLP 遺伝子の発現は血管内皮細胞のみに限局し、生後 1 週で最大であったが、8 週には検出できなかった (未発表)。しかし、*Ngsk Prnp^{0/0}* マウス脳では、おそらく PrP 遺伝子エクソン 3 のスプライシングアクセプターを含むイントロン 2 領域の欠損のため、PrP 遺伝子プロモーターから転写された pre-mRNA が PrP 遺伝子エクソン 3 で止まらず PrPLP 遺伝子まで伸び、その後 PrP エクソン 2 と PrPLP との間で遺伝子間スプライシングが起り、PrP と PrPLP とのキメラ mRNA が産生されたと考えられた。実際、正常な PrP 遺伝子イントロン 2 領域を持つ *Zrch Prnp^{0/0}* マウスでは、このような異常 mRNA は認められなかった⁵⁾。また、Moore らは、PrPLP 遺伝子は PrP 遺伝子の 16kb 下流に存在することを報告している²⁾。さらに、ベータグロビン遺伝子のスプライシングアクセプターを含む最後のイントロン領域が欠損すると、転写機構に障害が生じ、ベータグロビン pre-mRNA は停止信号を超えて伸長することが報告されている⁶⁾。このような異常な遺伝子間スプライシングにより、PrPLP は PrP プロモーターの調節のもとに過剰に発現し、またプルキンエ細胞をはじめとした神経細胞に異所性に発現するようになったと考えられる。プルキンエ細胞死を呈する他の *Rcm0 Prnp^{0/0}* マウスでも、同様の現象が認められたことが報告されている²⁾。PrP 遺伝子を再導入することでプルキンエ細胞変性死が回復するという結果⁷⁾を合わせて考えると、これらの結果は、PrP 非存在下での PrPLP の異所性発現がプルキンエ細胞の変性脱落に関与していることを強く示唆した。しかしながら、現在のところ詳細については明らかでなく、現在検討中である。また、PrPLP はプリオン病に関与しているのかどうかという大変興味深い問題についても現在検討中である。

〔参考文献〕

- 1) Sakaguchi, S., Katamine, S., Nishida, N., Moriuchi, R., Shigematsu, K., Sugimoto, T., Nakatani, A., Kataoka, Y., Houtani, T., Shirabe, S., Okada, H., Hasegawa, S., Miyamoto, T., and Noda, T.: Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature*. 380: 528-531, 1996
- 2) Moore, R. C., Lee, I. Y., Silverman, G. L., Harrison, P. M., Strome, R., Heinrich, C., Karunaratne, A., Pasternak, S. H., Chishti, M. A., Liang, Y., Mastrangelo, P., Wang, K., Smit, A. F. A., Katamine, S., Carlson, G. A., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., Melton D. W., Tremblay, P., Hood, L. E., and Westaway, D.: Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J. Mol. Biol.* 292: 797-817, 1999
- 3) Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguet, M. and Weissmann, C.: Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*. 356, 577-582, 1992
- 4) Manson, J. C., Clarke, A. R., Hooper, M. L., Aitchison, L., McConnell, I., and Hope, J.: 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol. Neurobiol.* 8: 121-127, 1994
- 5) Li, A., Sakaguchi, S., Atarashi, R., Roy, B. C., Nakaoka R., Arima K., Okimura, N., Kopacek, J., and Shigematsu, K.: Identification of a novel gene encoding a PrP-like protein expressed as chimeric transcripts fused to PrP exon 1/2 in ataxic mouse line with a disrupted PrP gene. *Cell. Mol. Neurobiol.* in press, 2000
- 6) Antoniou, M., Geraghty, F., Hurst, J. and Grosveld, F.: Efficient 3'-end formation of human beta-globin mRNA in vivo requires sequences within the last intron but occurs independently of the splicing reaction. *Nucleic Acids Res.* 26, 721-729, 1998
- 7) Nishida, N., Tremblay, P., Sugimoto, T., Shigematsu, K., Shirabe, S., Petromilli, C., Erpel, S. P., Nakaoka, R., Atarashi, R., Houtani, T., Torchia, M., Sakaguchi, S., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., and Katamine, S.: A mouse prion protein transgene rescues mice deficient for the prion protein gene from Purkinje cell degeneration and demyelination. *Lab. Invest.* 79: 689-697, 1999

〔研究発表〕

1.論文発表

- 1) Nishida, N., Tremblay, P., Sugimoto, T., Shigematsu, K., Shirabe, S., Petromilli C., Erpel S.P., Nakaoka, R., Atarashi, R., Houtani, T., Torchia, M., Sakaguchi, S., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., and Katamine, S.: A mouse prion protein (PrP) transgene rescues Purkinje cell degeneration and demyelination in mice deficient for PrP. *Lab. Invest.* 79, 689-697, 1999
- 2) Moore, R.C., Lee, I.Y., Silverman, G.L., Harrison, P.M., Strome, R., Heinrich, C., Karunaratne, A., Pasternak, S.H., Chrishti, M.A., Liang, Y., Mastrangelo, P., Wang, K., Smit, A.F.A., Katamine, S., Carlson, G.A., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Melton, D.W., Tremblay, P., Hood, L.E., and Westaway, D.: Ataxia in prion protein (PrP) deficient mice associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J. Mol. Biol.* 292 (4), 797-817, 1999
- 3) Deli, M. A., Niwa, M., Katamine, S., and Abraham, C. S.: Pentosan in transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet* 353, 1272, 1999
- 4) Kopacek, J., Sakaguchi, S., Shigematsu, K., Nishida, N., Atarashi, R., Nakaoka, R., Moriuchi, R., Niwa, M., and Katamine, S.: Upregulation of the genes encoding lysosomal hydrolases, a perforin-like protein, and peroxidases in the brains of mice affected with an experimental prion disease. *J. Virol.* 74, 411-417, 2000
- 5)片峰茂：クロイツフェルト-ヤコブ病 生体の科学 50巻5号「病気の分子細胞生物学」、502-503, 1999
- 6)片峰茂：プリオン 「微生物学」(畑中正一、嶋田基五郎編集)、文光堂、pp608-616, 1999

2.学会発表

- 1) Katamine S, Kopacek J, Sakaguchi S, Atarashi R, Nakaoko R, Li A, Niwa M, Shigematsu K: Upregulation of the genes encoding lysosomal hydrolases and a perforin-like protein in microglia colocalized with vacuolar neurodegeneration in the brains of mice affected with an experimental prion disease. *Characterization and Diagnosis of Prion Diseases in Animals and Man* in Tübingen, Germany, Sept. 23-25, 1999
- 2) Valenti P, Nishida N, Sakaguchi S, Katamine S, Wolfer DP, Lipp HP: Prionless mice with late-onset ataxia: the neurological phenotype does not segregate from the gene targeting construct after crossing with an asymptomatic line of prionless mice. *Characterization and Diagnosis of Prion Diseases in Animals and Man* in Tübingen, Germany, Sept. 23-25, 1999
- 3) 片峰茂：プリオンと神経疾患. 日本学術会議 50 周年記念シンポジウム「分子生物学と環境」、金沢市、平成 11 年 1 月 30 日
- 4) 片峰茂：プリオン病. 第 25 回日本医学会総会「エイズと感染」、東京、平成 11 年 4 月 3 日
- 5) 片峰茂：プリオン病の病態と分子診断. 第 46 回日本臨床病理学会総会シンポジウム「神経変性疾患の分子診断」、熊本市、平成 11 年 11 月 11 日
- 6) 新竜一郎、坂口末廣、中桶了太、有馬和彦、森内良三、片峰茂：プリオン蛋白欠損マウスに見られる脱髄の分子機構の解明. 第 47 回日本ウイルス学会総会、横浜市、平成 11 年 11 月 9 日
- 7) 中桶了太、坂口末廣、新竜一郎、有馬和彦、西田教行、李愛民、片峰茂：プリオン病感染マウス各組織の感染価と異常プリオン蛋白の比較検討. 第 47 回日本ウイルス学会総会、横浜市、平成 11 年 11 月 9 日
- 8) 李愛民、坂口末廣、新竜一郎、中桶了太、有馬和彦、片峰茂：Identification of peptides bound to a recombinant prion protein (PrP 121-231). 第 47 回日本ウイルス学会総会、横浜市、平成 11 年 11 月 9 日
- 9) 李愛民、坂口末廣、新竜一郎、中桶了太、重松和人、片峰茂：プリオン蛋白類似蛋白 (PrPLP) をコードする新規遺伝子の発見. 第 22 回日本分子生物学会年会、福岡市、平成 11 年 12 月 9 日

〔知的所有権の取得状況〕

なし

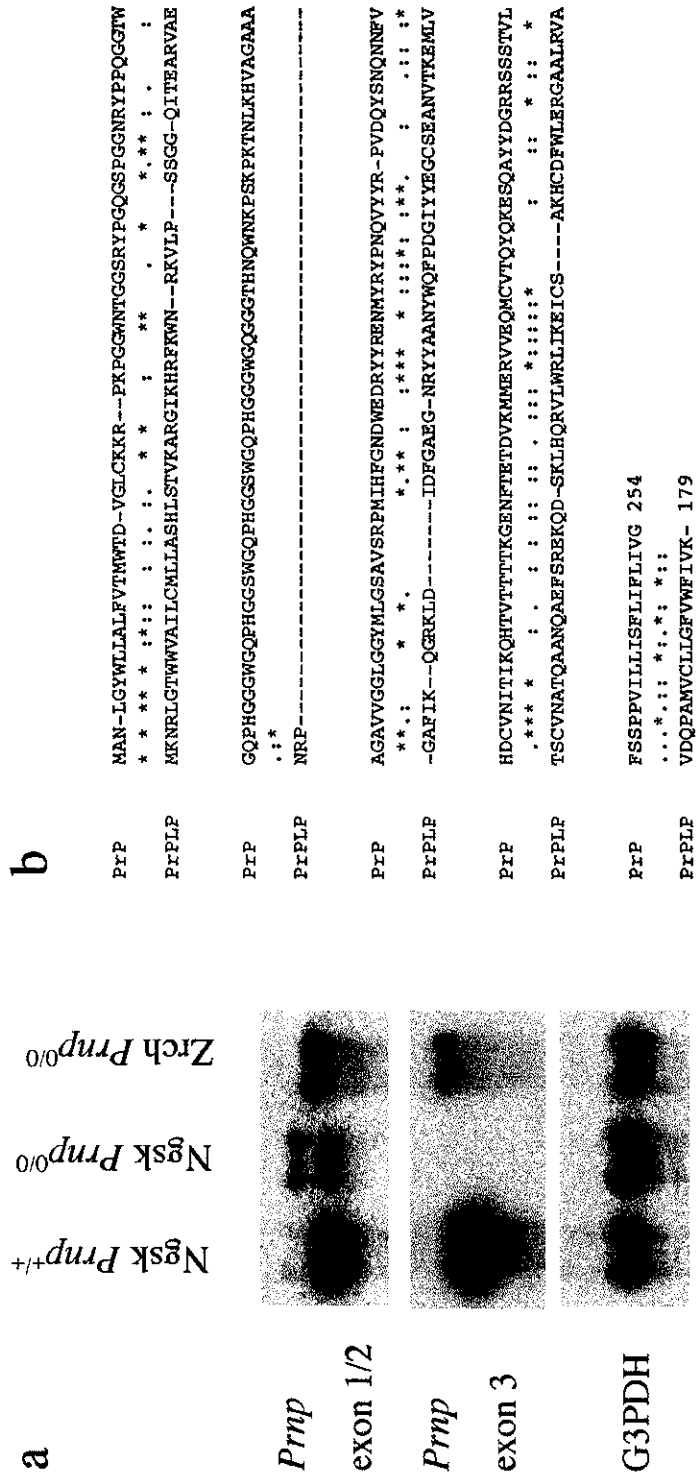


図1 : Ngsk *Prnp*^{0/0}マウス脳におけるPrPLPの過剰発現。 (a) Ngsk *Prnp*^{+/+}、
Ngsk *Prnp*^{0/0}、Zrch *Prnp*^{0/0}マウス脳のノーザンブロットング解析。 Ngsk
Prnp^{0/0}マウス脳にexon1/2のみで検出される異常mRNAが発現している。 (b) 異
常mRNAはPrPと高い類似性を呈するPrPLPをコードしている。 (*)、同一ア
ミノ酸 (*); (:) 類似性の高いアミノ酸; (·) 類似性の弱いアミノ酸。