

厚生省特定疾患調査研究事業

**家族性及び外因性プリオン病の
発症遅延方策に関する介入研究**

平成11年度研究報告書

平成12年3月

主任研究者 片 峰 茂

厚生省特定疾患調査研究事業

家族性及び外因性プリオン病の
発症遅延方策に関する介入研究

平成11年度研究報告書

平成 12 年 3 月

主任研究者 片 峰 茂

はじめに

平成11年度の「家族性及び外因性プリオン病の発症遅延方策に
関する介入研究」の研究報告を公表する

平成 12 年 3 月

主任研究者 片 峰 茂

目 次

総括研究報告書	1
分担研究報告書	
1. PrP類似蛋白 (PrPLP) の発見と そのプリオン蛋白 (PrP) への結合能の検討	5
長崎大・医・細菌学	片 峰 茂
2. プリオン病の発病阻止	15
東北大・院医・病態神経学	北 本 哲 之
3. ヒト・プリオン病発症遅延薬物の評価	19
九州大・院医・動物実験施設	毛 利 資 郎
4. ライソゾーム修飾薬剤による感染症型 プリオン蛋白の沈着阻害	26
九州大・院医・脳研病理	堂 浦 克 美
研究成果の刊行に関する一覧表	31

研究班構成

区 分	氏 名	所 属 施 設 名	所 属 施 設 に お け る 職 名	T E L F A X
主任研究者	片 峰 茂	長崎大学 医学部 細菌学講座	教 授	T 095-849-7057 F 095-849-7060
分担研究者	北 本 哲之	東北大学大学院 医学系研究科 病態神経学講座	教 授	T 022-717-8147 F 022-717-8148
分担研究者	毛 利 資郎	九州大学大学院 医学系研究科 動物実験施設	教 授	T 092-642-6147 F 092-642-6165
分担研究者	堂 浦 克美	九州大学大学院 医学系研究科 脳神経病研究施設	講 師	T 092-642-5537 F 092-642-5540

總 括 研 究 報 告

厚生科学研究費補助金特定疾患対策事業
「家族性及び外因性プリオン病の発症遅延方策に関する介入研究」 班会議

平成11年12月17日（金）午後4時～6時
長崎大学医学部ポンペ会館

プログラム

司会：片峰 茂（長崎大学医学部・細菌学）

- (1) 「PrP類似蛋白（PrPLP）をコードする新規遺伝子の発見」
坂口末廣（長崎大学医学部・細菌学）
- (2) 「PrP遺伝子コンディショナルターゲティングのためのコンストラクト」
有馬和彦（長崎大学医学部・細菌学）
- (3) 「PrP結合ペプチドの同定とその性状」
李 愛民（長崎大学医学部・細菌学）
- (4) 「プリオン病発症遅延薬剤の検討」
毛利資郎（九州大学大学院医学系研究科・動物実験施設）
- (5) 「ライソゾーム修飾薬剤による感染型プリオン蛋白の沈着阻害」
堂浦克美（九州大学大学院医学系研究科・神経病理学）
- (6) 「プリオン病の発病遅延」
北本哲之（東北大学大学院医学系研究科・病態神経学）

総 括 研 究 報 告

〔研究課題名〕

家族性及び外因性プリオン病の発症遅延方策に関する介入研究

〔主任研究者氏名〕

片 峰 茂 (長崎大・医・細菌学)

〔分担研究者氏名〕

北 本 哲 之 (東北大・院医・病態神経)

毛 利 資 郎 (九州大・院医・動物実験施設)

堂 浦 克 美 (九州大・院医・脳研病理)

〔研究目的〕

クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) をはじめとするプリオン病には、現在のところ有効な臨床治療手段がないのが現状である。我が国では、不幸にも硬膜移植後のCJD患者が60名をこえ感染性プリオン病の脅威にさらされている。硬膜移植は年間2万例の症例に実施されており、旧処理法の硬膜は約10年間使用されていた。つまり潜在的に危険な硬膜移植患者は20万人に達する。また、我々の遺伝子解析の結果、家族性プリオン病の家系が多数日本に存在することが明らかとなり、日本で発病するプリオン病の15%が何らかの遺伝子変異の存在する家族性プリオン病である。プリオン病は発病すると手の施しようがなく、発病させないつまり発病遅延をさせる方策を開発することが緊急の課題である。しかしながら有効性の裏付けのある方策は未だ存在せず、臨床現場での患者(保因者)を対象とした介入研究には未だ倫理的に問題が多い。我々は現時点においては、プリオン病モデルを利用した薬剤の有効性評価系の確立と、発症遅延方策のための新規の薬剤・方法論の開発が何よりも先決であると考えた。

プリオン病の本態が正常プリオン蛋白 (PrP^C) の異常プリオン蛋白 (PrP^{Sc}) への翻訳後変換であることが判明しているため、この変換制御が発症遅延方策の眼目となる。また PrP^C 発現量がプリオン病の潜伏期を規定することから遺伝子治療による PrP^C 発現制御も有望な試みであり、特徴的なプリオン病脳組織病変(海綿状神経変性)形成に直接関与する細胞因子も発症遅延薬剤の標的となりうる。そこで本研究班においては、(1) 試験管内(無細胞系)、培養細胞、動物の異なる3システムを用いてプリオン病発症遅延方策の有効性評価系を確立し、それによ

り既知あるいは新規の薬剤（方策）の有効性を検討すること、とくに遺伝子改変技術により外因性および家族性プリオン病双方のマウスモデルを作製すること、(2) 正常宿主蛋白、及びファージディスプレイ法により同定されるプリオン蛋白と物理的に相互作用をするペプチドをプリオン蛋白変換制御物質の候補として検索すること、(3) コンディショナル・ターゲティング法によりプリオン接種前後の様々な時期に正常型プリオン蛋白の発現量を人為的に制御することのできるマウスを作出しこれを用いて遺伝子治療の可能性を探ること、(4) プリオン病脳組織病変（海綿状神経変性）形成に直接関与する細胞因子を同定しそれに対する制御薬剤を開発すること、を具体的目標とすることとした。

われわれは、昨年度すでに以下の成果をあげている。(1) プリオン感染神経芽細胞腫由来細胞株 (N2a) より異常プリオン蛋白 (PrP^{Sc}) 高産生細胞を得た。この細胞クローンはPrP^C を効率よく PrP^{Sc} へ変換するため、PrP^{Sc} 生成検出系として有用であることが判った。(2) 従来の 家族性プリオン病マウスモデル(GSS, P102L) は発病はするものの、プロテナーゼK抵抗性 PrP の蓄積をほとんど来たさず、野生型マウスへの伝播も成功していない。そこで、新たなモデルとして FFI 型変異 (D177N) を有する PrP 遺伝子トランスジェニックマウスの作製を試み、変異型遺伝子の野生型マウスへの導入に成功した。(3) ランダムペプチドライブラリよりリコンビナント PrP への結合活性を有するファージをパニング法により濃縮し、独立した6種類のファージクローンを得た。うち3種類のファージに対応する合成ペプチドのPrPへの直接結合を確認した。(4) cDNA サブトラクション法により、プリオン感染脳に過剰発現する4種類の既知遺伝子を新規に同定した。うち3者はミクログリア由来であり神経障害因子として機能する可能性が考えられた。

本年度は、上記研究課題を継続して遂行したが、本報告書では特に成果の得られた以下の4課題について報告する。

〔研究方法〕

(1) 毛利は昨年選出したプリオン病発症遅延薬剤の候補のうち、アムフォテリシンB (AmB) とクロロキン (CQ) について、外来性プリオン病モデルとしてヒト由来のマウス順化CJD (GSS) 株であるF1株と感受性の高いマウス系統であるNZWマウスの組み合わせで、発症遅延マウスの動物モデルによる評価を行った。(2) 堂浦はライソゾーム機能を修飾する化学物質の中で臨床応用可能なものについて、プリオン病持続感染培養細胞を用い感染型プリオン蛋白の産生沈着阻害効果を調べ、その阻害機序について検討を行った。(3) 北本はトランスジェニック・マウスを用いた動物モデルで種の異なる正常プリオン蛋白が、別の種類のプリオン蛋白の異常化への変換を定量的に抑制するか否かを検討した。すなわち、

ヒト型のトランスジェニック・マウスの内、あまり発現量の多くないChW#30と129#12の系統を用いて、マウスプリオン蛋白の発現量が異なるablated、hemizygous、wild backgroundそれぞれにsporadic CJDの発病脳を頭蓋内投与しマウスプリオン蛋白のヒトプリオン蛋白異常化に対する抑制効果が観察可能かどうかを検討した。(4) 片峰らは独自に作製した PrP 欠損マウス (N_{gsk} Prnp^{0/0}) 脳組織で異所性に発現するPrP類似蛋白 (PrPLP)をコードする新規遺伝子を発見するとともに、PrPLPとPrPとの物理的会合を介した相互作用の可能性を検討した。

〔結果と考察〕

(1) プリオン脳内接種マウスへの、AmB腹腔内投与で明らかな発症遅延と潜伏期間の延長が認められた。このAmBの効果は感染初期にのみならず、プリオンの脳内蓄積が起きていると考えられる中期以降の投与においても潜伏期間が延長することが判明した。これはCJDのモデルでは最初であり、臨床応用の道が開かれた。一方、CQについては濃度を3段階に設定し、感染前から投与したが、いずれも潜伏期間の延長は認められなかった。(2) ライソゾーム嗜好性薬剤のquinacrineやシステインプロテアーゼ阻害剤のE-64dが低濃度でプリオン病持続感染培養細胞における感染型プリオン蛋白の産生沈着阻害効果を示したが、特にE-64dは有効濃度範囲が広く極めて有効であった。これらの薬剤は、正常型プリオン蛋白の代謝に影響せず、正常型プリオン蛋白から感染型プリオン蛋白への転換反応にも影響しなかったことより、間接的に感染型プリオン蛋白の産生を阻害しているかあるいはその半減期を短縮しているものと推定された。(3) マウスプリオン蛋白のヒトプリオン蛋白の異常化に対する抑制効果を見る実験では、ChW#30において潜伏期間はablatedが平均154日、hemizygousが215日、wildが367日であった。一方、129#12においては、ablatedが平均172日、hemizygousが259日、wildが319日であった。当初の予想通りに、マウスのプリオン蛋白はヒト化プリオン蛋白の異常化への変換をdose-dependentに抑制するという結果が得られた。(4) N_{gsk} Prnp^{0/0}の脳組織にPrnp exon 1/2とハイブリダイズする異常mRNAを同定した。このmRNAはZrch Prnp^{0/0}には存在しない。cDNA構造解析によりこのmRNAはPrnpイントロン構造破壊に起因するPrP遺伝子と下流の新規遺伝子の間でのintergenic splicingに基づく融合mRNAであることが判明した。この新規遺伝子はPrP類似蛋白 (PrPLP) をコードするORFを有し、PrPとの相同性は一次構造レベルでは25%程度であるが、共に膜糖蛋白であり極めて類似した二次構造を有する。N_{gsk} Prnp^{0/0}における異常mRNAの発現はPrnpプロモーターにドライブされ、その結果PrPLPの神経細胞での異所性発現が惹起されていることが判明した。さらにPrPLPがPrPと高い類似性を示すことより、両者の相互作用について、免疫共沈

法と光学バイオセンサー(IAsys)を用いて検討した。免疫共沈法にて、レコンビナントPrPLPとPrPとが物理的に結合することが分かった。さらに、IAsys法にてレコンビナントPrPLPは高い結合力 ($KD=3.21 \times 10^{-8}$ 、 $Kd=3.04 \times 10^{-3}$ 、 $Ka=9.49 \times 10^4$) でPrPに会合した。

〔結 論〕

(1) アムフォテリシンBはCJDモデルマウスの潜伏期間を延長し、CJDの発症遅延の効果があることが示され、腎毒性が克服できれば臨床応用が可能であることが示唆された。(2) ライソゾーム嗜好性薬剤のquinacrineやシステインプロテアーゼ阻害剤のE-64dが、低濃度でプリオン病持続感染培養細胞において感染型プリオン蛋白の産生沈着を阻害することを明らかにした。特にE-64dは有効濃度範囲が広く本邦においてヒトの治験薬剤として用いられたことがあり、その有効性が動物実験で確認できれば早期にヒトへの臨床応用が可能である。(3) 2種類のプリオン蛋白を共に発現しているトランスジェニックマウスを用いて、ヒト・プリオン蛋白の異常化への変換が、マウスの正常型のプリオン蛋白によってdose-dependentlyに抑制されることを明らかにした。(4) PrP類似蛋白 (PrPLP) をコードする新規遺伝子を同定した。PrPLPが物理的にPrPと会合することが判明し、PrPLPがPrPの異常化に影響を及ぼす可能性が示唆された。

分 担 研 究 報 告

PrP類似蛋白 (PrPLP) の発見とそのプリオン蛋白 (PrP) への結合能の検討

班 員：片 峰 茂 (長崎大・医・細菌学)
研究協力者：李 愛 民 (長崎大・医・細菌学)
坂 口 末 廣 (長崎大・医・細菌学)
新 竜一郎 (長崎大・医・細菌学)
中 桶 了 太 (長崎大・医・細菌学)
有 馬 和 彦 (長崎大・医・細菌学)
重 松 和 人 (長崎・医・第二病理学)

〔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同定した。PrPLP遺伝子は正常マウス脳の血管内皮細胞に発現し、生後6日に最大になり、その後減少し8週には検出できなくなった。しかし、プルキンエ細胞脱落を呈するPrP遺伝子欠損マウス脳では、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参与していることを示唆した。さらに興味深いことに、PrPLPとPrPが物理的に結合することを明らかにした。脳血管内皮細胞では両者がともに発現しており、PrPLPとPrPの会合がそれぞれの機能に重要であることを示唆している。

〔研究目的〕

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*Prnp^{0/0}*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ティング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。一つの可能性として、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ことが考えられた。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限局していた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。さらに、PrPLPとPrPの相互作用の可能性を考え、両者の物理的会合の有無について検討を加えた。

〔研究方法〕

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°C15分を1回、さらに0.1×SSC / 0.1% SDSで65°C15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、プロトコルに従い行った。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%パラホルムアルデヒドにて固定した後、5mm厚の切片を作成した。脱パラ後、8 mg/mlペプシンで37°C10分処理し、ハイブリダイゼーション(50%ホルマミド、10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM 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°C16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%ホルマミド/2×SSCで50°C30分行った。さらに、20 mg/ml RNase Aで37°C30分処理し、0.2×SSCで60°C20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。

5) 免疫共沈法

まず、精製レコンビナントPrP (121-231) とPrPLP (23-154) をPBS中に混入し、4°Cにて一晩反応させた。プロテインA-セファロースCL-4Bと抗PrPウサギ血清、または抗PrPLPウサギ血清にて免疫沈降を行い、それぞれの免疫複合体をSDS-PAGEに供した。その後、抗PrPウサギ血清、または抗PrPLPウサギ血清をもちいてウエスタンブロッティングを行った。

6) 光学バイオセンサー (Iasys, Affinity SENSORS) による解析

精製レコンビナントPrP (121-231) をCM-Dextranキュベットに固定し、75-900nMまでの異なる精製レコンビナントPrPLP (23-154) を反応させ、 K_D 、 K_A 、 K_D を算出した。

[結果と考察]

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1b）をコードする領域を有するキメラmRNAであることが明らかとなった。さらに、これらのmRNAはalternative splicingにより産生されることが明らかとなった。これらの結果は、Nsgk *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の発現をノーザンプ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、Nsgk *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）。

次に、PrPLPがPrPと高い類似性を示すことより、両者の相互作用について、免疫共沈法と光学バイオセンサー(IAsys)を用いて検討した。図4aに示すように、免疫共沈法にて、レコンビナントPrPLPとPrPとが物理的に結合することが分かった。さらに、IAsys法にてレコンビナントPrPLPは高い結合力（ $KD=3.21 \times 10^{-8}$ 、 $Kd=3.04 \times 10^{-3}$ 、 $Ka=9.49 \times 10^4$ ）でPrPに会合した（図4b、未発表）。

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、Nsgk *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、この様な異常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

様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参与していることを強く示唆した。

さらに、PrPLPとPrPがin vitroシステムで物理的に結合することが判明した。PrPLPがPrPの異常化の制御分子である可能性が十分に考えられる。また我々は、in situ hybridizationにて両者が脳血管内皮細胞や精巣セルトリ細胞の膜表面に発現していることも確認した（未発表）。これらの細胞上でPrPLPとPrPがその機能を行うには両者の会合が必要であることを示唆しているのかも知れない。さらに、その他の細胞ではPrPLPと同様な機能をもつPrPLP以外のPrP類似蛋白が発現している可能性も示唆している。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。PrPLPの同定は、これからのプリオン病の研究にも大きな影響を与えるかも知れない。PrPLPが、プリオン病にどのように関与している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。

〔結論〕

PrP類似蛋白 (PrPLP) をコードする新規遺伝子を同定した。PrPLPが物理的にPrPと会合することが判明し、PrPLPがPrPの異常化に影響を及ぼす可能性が示唆された。

〔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. *Labo. Invest.* 79: 689-697, 1999

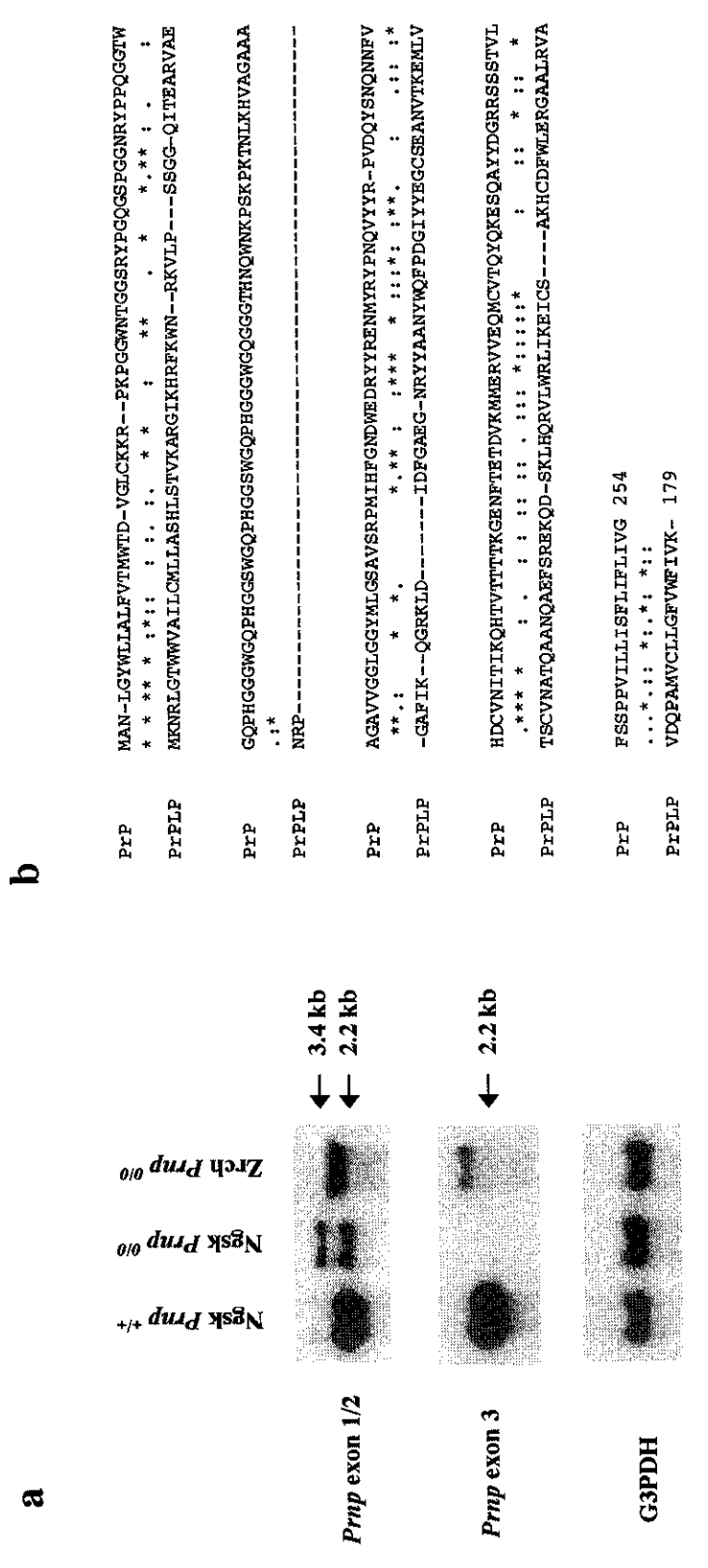


図1 : Nsgk *Prnp*^{0/0}マウス脳内におけるPrP類似蛋白 (PrPLP) の過剰発現。
 (a) Nsgk *Prnp*^{+/+}、Nsgk *Prnp*^{0/0}、Zrch *Prnp*^{0/0}マウス脳の前角質のノーザン
 ブロットティング。(b) PrPLPとPrPのアミノ酸構造の比較。

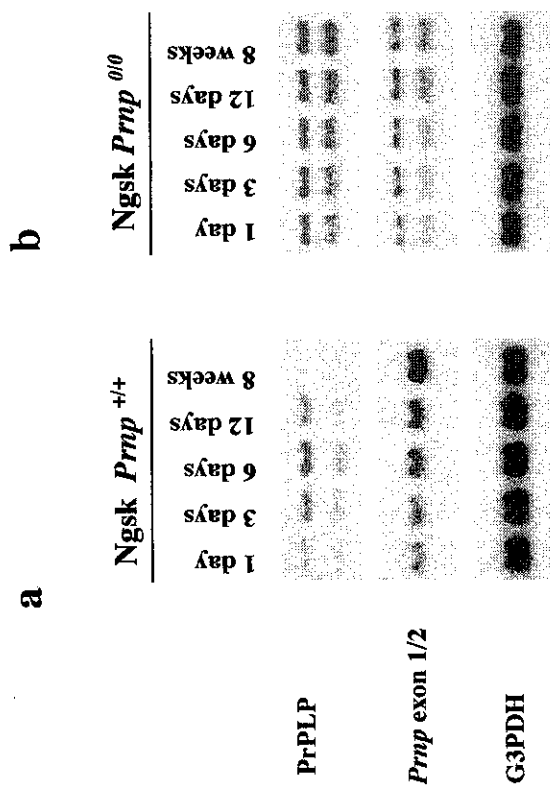


図2 : *Ngsk Prnp*^{+/+}および*Prnp*^{0/0}マウス脳
におけるPrPLP発現の経時的変化