

図一1 : **a.** *in vitro* cleavage assayを用いたプリオンタンパク質分解活性の検討。抗プリオン抗体 (3F4) を用いたイムノプロットで21-、18-、14-、11/12-kDaの分解産物を検出した。**b.** PrPaseによる推定上の切断部位を模式的に示した。4カ所の部位はそれぞれ α -、 β -、 γ -、 δ -PrPaseにより切断されると考えた。

ライソゾームにおける異常型プリオン蛋白の生成・分解に関する研究

班 員：堂浦 克美（九州大学・大学院医・脳研病理）

研究協力者：古川ひさ子、岩城 徹（九州大学・大学院医・脳研病理）

〔研究要旨〕

異常型プリオン蛋白の生成・分解とライソゾーム機能の関係を明らかにするため、スクレイピー持続感染細胞内のライソゾーム機能を解析した。感染細胞と非感染細胞から各々精製したライソゾーム分画を用いた実験の結果、非感染細胞の正常型プリオン蛋白は両者で同等に分解された。しかし、感染細胞の正常型プリオン蛋白と異常型プリオン蛋白の分解は非感染細胞のライソゾームに比較して感染細胞のライソゾームでは減弱していることが判った。そこで、異常型プリオン蛋白生成・蓄積の原因としてライソゾームの機能異常が関与する可能性を *in vivo* で検討するため、ライソゾームの異常を生じるクロロキン投与実験ミオパチーをハムスターにおいて作製した。その結果、多数の変性筋細胞に出現した自己貪食胞内に異常型プリオン蛋白様の性質を持つプリオン蛋白が蓄積していることが明らかとなった。これらのことから、異常型プリオン蛋白生成・蓄積の原因の一つとしてライソゾームの機能異常が示唆された。

Research on the accumulation and degradation of abnormal isoform of prion protein in the lysosome

Katsumi DOH-URA, Hisako FURUKAWA, Toru IWAKI

Department of Neuropathology, Neurological Institute, Kyushu University

ABSTRACT

We examined the role of lysosome in the biosynthesis and degradation of abnormal isoform of prion protein (PrPres). Both lysosome and PrP were purified from either scrapie-infected cells or control cells. Normal PrP (PrPc) purified from the control cells was digested with the lysosomal extract from the infected cells as efficiently as with that from the control cells. However, both PrPc and PrPres of the infected cells were digested less efficiently with the lysosomal extract from the infected cells than that of the control cells. This suggested that lysosomal dysfunction might be one of the factors promoting PrPres accumulation or biosynthesis. Then, we developed chloroquine myopathy in hamsters as an *in-vivo* model, in which continuous administration of chloroquine induced lysosomal dysfunction and caused dystrophic myopathy with autophagic vacuoles. It was demonstrated that PrP accumulated in the autophagic vacuoles of the dystrophic muscles, and that PrP showed similar properties of PrPres such as PK resistancy, detergent insolubility, and transmissibility of PrP properties. These findings indicate that lysosomal dysfunction is one of the important factors for PrPres biosynthesis and its accumulation in the cells.

〔はじめに〕

我々はこれまでにライソゾームに存在する蛋白分解酵素の発現が、異常型プリオン蛋白の蓄積と相関してプリオン病罹患脳で増加することを *in vivo* で明らかにした。また、スクレイピー持続感染細胞においてライソゾーム機能を阻害する薬剤が異常型プリオン蛋白の生成を抑制することを明らかにした。これらの成果から、異常型プリオン蛋白の生成分解にはライソゾームが重要な役割を果たしていることが示唆される。そこで異常型プリオン蛋白の蓄積とライソゾーム機能の関係をより具体的に

明らかにするため、スクレイピー持続感染細胞内のライソゾームにおける異常型プリオン蛋白の分解能を解析した。さらに、その結果をもとにライソゾーム機能異常と異常型プリオン蛋白の関係を *in vivo* で検討するために、ライソゾームの異常を生じるクロロキン投与実験ミオパチーをハムスターにおいて作製し、筋病変に蓄積してくるプリオン蛋白にどのような生化学的変化が生じるか検討した。

〔材料および方法〕

in vitro 解析 スクレイピー持続感染神経芽細胞腫細胞(ScNB)あるいは非感染細胞（未感染同細胞 NB と Congo red 存在下で 3 継代培養した ScNB）において正常型プリオン蛋白あるいは異常型プリオン蛋白を既報 1)のごとく metabolic labeling にて ^{35}S で標識し、DLPC 液に溶解後に免疫沈降法を用いて精製した。さらに文献 2) に従い各細胞よりライソゾーム可溶性画分を調製した。精製した ^{35}S 標識プリオン蛋白にライソゾーム可溶性画分を混合し、pH4.5 にて 12 時間反応させたものを SDS-PAGE で解析した。また、各細胞より精製した ^{35}S 標識正常型プリオン蛋白を低濃度の proteinase K(PK)で消化し PK 分解抵抗性を検討した。

in vivo モデルの作製と解析 シリアンハムスターにクロロキン (50mg/kg) を連日 2 ヶ月間腹腔内に投与した。腓腹筋、ヒラメ筋、大腿四頭筋を採取し凍結切片を作製した後、各種抗体 (表 1) を用いて免疫組織学的検討を行った。また、変性筋に蓄積したプリオン蛋白の生化学的性質を PK に対する分解抵抗性と界面活性剤存在下での難溶性について正常な対照筋肉のプリオン蛋白と比較検討した。さらに、このプリオン蛋白の感染性を検証するために筋肉乳剤をハムスターとハムスタープリオン蛋白を過剰発現する Tg7 マウスの脳内に接種し、9 ヶ月後に屠殺して脳の組織病理とプリオン蛋白の PK 分解抵抗性について検討した。

（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〕

ScNB 細胞のライソゾーム機能の解析

ScNB と非感染細胞（未感染細胞と Congo red 処理 ScNB）から各々精製したライソゾーム画分を用いた実験の結果、非感染細胞由来の正常型プリオン蛋白は両者で同等に分解された。しかし、ScNB 由来の正常型プリオン蛋白と異常型プリオン蛋白の分解は非感染細胞のライソゾームに比較して ScNB のライソゾームでは減弱していることが判った。また、ScNB の正常型プリオン蛋白は、非感染細胞の正常型プリオン蛋白に比較して低濃度の PK 分解に対して抵抗性を示すことがわかった。

実験モデルの作製と解析

シリアンハムスターにクロロキン (50mg/kg) を連日 2 ヶ月間投与することにより腓腹筋、ヒラメ筋、大腿四頭筋のいずれにも無数の自己貪食胞を伴う筋変性の像が観察された。

免疫組織化学 変性筋線維内の自己貪食胞には縁取り空胞 (rimmed vacuole; RV) 形態を呈するものの他にヘマトキシリン好性に染色される粗大顆粒状の形態を呈するものが観察された。表 1 に示すように RV と粗大顆粒は同様の免疫染色性を示し、正常では神経筋接合部にのみ見られるプリオン蛋白が変性筋線維では神経筋接合部の局在が消失し RV や粗大顆粒に染色された (図 1)。また、正常筋線維では染色されないカテプシン、ヘパラン硫酸やユビキチンが変性筋の RV や粗大顆粒で染色された。**プリオン蛋白の PK 分解抵抗性** 変性筋から抽出したプリオン蛋白と正常筋から抽出したプリオン蛋白について PK 抵抗性について検討したところ、通常のプリオン病罹患脳に見られる異常型プリオン蛋白が示す濃度での PK 抵抗性や N 末側の truncation は見られなかったが、低濃度での PK 分解処理に対しては正常筋由来のプリオン蛋白に比べて変性筋のプリオン蛋白に PK 分解抵抗性が見られた。

プリオン蛋白の難溶性 NP-40 存在下でのプリオン蛋白の可溶性を比較した。正常筋のプリオン蛋白は 0.5%NP-40 で完全に可溶化されたが、変性筋では不溶性画分に多量のプリオン蛋白が存在した。

伝播実験 3 週齢シリアンハムスターおよび 5 週齢 Tg7 マウスに変性筋乳剤あるいは正常筋乳剤

(10% in saline)30 μ l を脳内接種した。接種後9ヶ月後のハムスター脳に明らかな形態学的変化は見られなかったが、脳から抽出したプリオン蛋白は対照の正常筋乳剤を接種したハムスター脳由来のプリオン蛋白に比べてPK分解抵抗性を示した。

〔考察〕

今回の *in vitro* の実験より感染性を維持しているスクレイビー持続感染細胞のライソゾーム機能は非感染細胞に比してプリオン蛋白分解能において低下していることが明かとなった。また、持続感染細胞の”正常型”プリオン蛋白には非感染細胞の正常型プリオン蛋白よりもPK分解抵抗性を示すものが含まれていることが明かとなった。このPK分解抵抗性を示す”正常型”プリオン蛋白はこれまでに定説となっている病気に必須の異常型プリオン蛋白の生化学的性質と異なるものであるが、プリオン病の病態にどのように関わっているのかは今後の検討課題である。今回我々はこれらの *in vitro* の実験結果をもとに異常型プリオン蛋白生成・蓄積の原因の一つとしてライソゾームの機能異常が関与する可能性を *in vivo* で検証するため、ライソゾームの異常を生じるクロロキン投与実験ミオパチーをハムスターにおいて作製した。

抗マラリア剤として広く用いられているクロロキンは、ライソゾーム内に濃縮されてライソゾーム内部のpH環境を変化させ、長期投与により骨格筋にRVなどの自己貪食胞を伴う変性を起こすことが知られている。この自己貪食胞内にはベータ蛋白をはじめとするAlzheimer病関連蛋白が蓄積する。一方、原因不明のRVを伴う封入体筋炎ではベータ蛋白などの他にプリオン蛋白がRVに蓄積するという報告がある。今回我々はハムスターの実験クロロキンミオパチーの変性筋の自己貪食胞内にプリオン蛋白が沈着することを明らかにした。また、このプリオン蛋白はPK分解抵抗性とNP-40に対する難溶性を示しており、かつ脳内接種によりPK分解抵抗性を他のPrPにも付与する可能性が示された。これらのことから異常型プリオン蛋白生成の原因の一つとしてライソゾームの機能異常が考えられ、実験クロロキンミオパチーはプリオン病の脳内で起こっているプリオン蛋白高次構造変換のモデルとして有用である。変性筋のPK分解抵抗性を持つプリオン蛋白は、9ヶ月の観察期間では脳内接種したハムスター脳に病変を起こさなかったが、PK分解抵抗性と異常型PrPの関係を明らかにする上で新たな知見を与えてくれるものと考えられる。

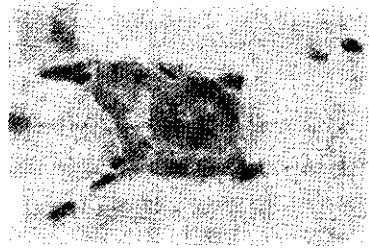
〔参考文献〕

- 1) 堂浦克美、岩城 徹：感染型プリオン蛋白の産生および安定性に影響する因子の探索。厚生省特定疾患遅発性ウイルス感染調査研究班。平成10年度研究報告書。114-116, 平成11年3月
- 2) Ezaki J, Wolfe LS, Kominami E.: Specific delay in the degradation of mitochondrial ATP synthase subunit c in late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis is derived from cellular proteolytic dysfunction rather than structural alteration of subunit c. J Neurochem. 67:1677-87, 1996

表1 免疫組織学的解析の結果

	クロロキンミオパチー		対照群
	RV	粗大顆粒	
PrP(3F4)	+	+	+ (神経筋接合部)
cathepsin B	+	+	-
heparan sulfate (10E4)	+	+	-
ubiquitin	+	+	-

図1 クロロキンミオパチーにおける変性筋内のプリオン蛋白沈着



3F4

プリオン蛋白類似蛋白 (PrPLP/Dpl) とプリオン感染実験

班 員：片峰 茂 (長崎大学・大学院医・感染分子病態)
共同研究者：坂口 末廣 (長崎大学・大学院医・感染分子病態)
新 竜一郎 (長崎大学・医学部・細菌)
重松 和人 (長崎大学・医学部・病理)

〔研究要旨〕

我々は、プリオン蛋白 (PrP) と高い類似性を持つ最初の蛋白である PrP 類似蛋白 (PrPLP/Dpl) がプリオン病の病態を修飾するのかどうかを検討した。PrP と PrPLP/Dpl の両方を発現している Ngsk *Prnp*^{0/+}マウスと PrP のみを発現している Zrch *Prnp*^{0/+}マウスに、プリオン感染マウス脳乳剤を脳内接種し、潜伏期間、脳の病理学的変化、および異常型 PrP (PrP^{Sc}) の脳内蓄積について比較検討した。Ngsk *Prnp*^{0/+}と Zrch *Prnp*^{0/+}マウスは、それぞれ 282±23 日と 286±27 日に発症し死亡した。また、両者とも大脳皮質及び海馬領域に著しい空胞変性が認められた。さらに、両者の脳に同様な PrP^{Sc} の蓄積も認められた。これらの結果は、PrPLP/Dpl がプリオン病に関与していないことを示した。

Elucidation of pathogenic involvement of prion protein-like protein (PrPLP/Dpl) in prion diseases

Sigeru KATAMINE¹⁾, Suehiro SAKAGUCHI¹⁾, Ryuichiro ATARASHI²⁾, Kazuto SHIGEMATSU³⁾

¹⁾Department of Molecular Microbiology and Immunology, Nagasaki Graduate School of Medical Sciences, Department of ²⁾Bacteriology, and ³⁾Pathology, Nagasaki University School of Medicine

ABSTRACT

In the present study, we elucidated whether or not prion protein-like protein (PrPLP/Dpl) could accelerate or attenuate the pathogenesis of prion diseases. Ngsk *Prnp*^{0/+} mice express both PrP^C and PrPLP/Dpl in the brains, whereas Zrch *Prnp*^{0/+} mice express only PrP^C. They were intracerebrally inoculated by a Fukuoka-1 prion strain and the incubation time, pathological changes and accumulation patterns of protease-resistant prion protein (PrP^{Sc}) in the brains of those mice were compared. Ngsk *Prnp*^{0/+} and Zrch *Prnp*^{0/+} mice died at 282±23 and 286±27 days after inoculation, respectively, with similar changes of vacuolation in cerebral cortex and hippocampus. Moreover, massive accumulation of PrP^{Sc} could be detected in both brains with same glycosylation. These results indicated that PrPLP/Dpl has no influence on the pathogenesis of prion diseases.

〔はじめに〕

我々が新規に同定したプリオン蛋白類似蛋白 (PrPLP/Dpl) 遺伝子は、正常マウス脳では血管内皮細胞のみに発現し、その発現様式は生後 1 週間まで増加し、その後次第に減少し、生後 8 週間には検出できなくなった¹⁾。これまで報告されている PrP 遺伝子欠損 (*Prnp*^{0/0}) マウスの中で、プルキンエ細胞の変性死を呈さない Zrch *Prnp*^{0/0} マウスの脳では、PrPLP/Dpl の発現は正常マウスと同様であった²⁾。しかし、プルキンエ細胞の変性死を呈する Ngsk *Prnp*^{0/0} マウスでは、PrPLP/Dpl が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²⁾。これは、Ngsk *Prnp*^{0/0} マウスのノックアウト遺伝子座で 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 が部分的に欠損するため、PrP 遺伝子プロモーターから転写された pre-mRNA が PrP 遺伝子の下流に存在する

PrPLP/Dpl 遺伝子にまで伸び、その後 PrP 遺伝子エクソン 1/2 と PrPLP/Dpl 遺伝子エクソン 2 との間で遺伝子間スプライシングが起こったことによる²⁾。

PrPLP/Dpl 遺伝子は、プリオン蛋白 (PrP) 遺伝子の 16kb 下流に位置し、PrP と一次構造レベルで 23% の類似性を保有する糖蛋白である²⁾。また、PrPLP/Dpl は PrP と同様に GPI アンカーにて細胞膜上に発現している³⁾。さらに、PrPLP/Dpl は PrP の N 末に存在する銅結合領域と考えられている octapeptide repeat 領域を欠失しているが、PrP の C 末領域と非常に高い構造類似性を持ち、三つの α ヘリックス、二つの S-S 結合、および二つの N 型結合糖鎖を有している⁴⁾。PrP はプリオン病の病態形成およびその病原体 (プリオン) の複製に必要な分子であることはよく知られている。PrPLP/Dpl と PrP との高い類似性を考えると、PrPLP/Dpl もプリオン病の病態およびプリオンの複製に関与するのか大変興味深い。

【目 的】

PrPLP/Dpl と PrP を同時に発現する Ngsk *Prnp*^{0/-} マウスと PrP のみを発現する Zrch *Prnp*^{0/+} マウスに福岡-1 プリオン株を接種し、発症までの潜伏期間、病理学的変化、および異常型 PrP (PrP^{Sc}) の蓄積について調べ、PrPLP/Dpl がプリオン病に関与しているのか検討した。

【材料と方法】

1) 感染実験

福岡-1 プリオン株感染後発症した野生型 (*Prnp*^{+/+}) マウスから脳を摘出し、PBS にて 10% (w/v) 感染脳乳剤を作成した。その乳剤 20 μ l を Ngsk *Prnp*^{0/-} マウスと Zrch *Prnp*^{0/+} マウスにそれぞれ脳内接種し、発症死亡するまで観察した。またさらに、発症した Ngsk *Prnp*^{0/+} マウスから脳を摘出し PBS にて 10% (w/v) 乳剤を作成した後、Ngsk *Prnp*^{+/+}、Ngsk *Prnp*^{0/+}、Ngsk *Prnp*^{0/0} マウスにそれぞれ 20 μ l 脳内接種し約 1 年間観察した。

2) ノーザンブロットング法

野生型 (*Prnp*^{+/+}) マウス、Ngsk *Prnp*^{0/0} マウス、福岡-1 プリオン株にて感染発症した ddY マウス、および PBS のみを脳内接種した ddY マウスからそれぞれ脳を摘出し、TRIZOL 試薬 (GibcoBRL Life Technologies, Inc.) を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA は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 \times 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 \times SSPE、5 \times デンハルト液、0.5% SDS、10% 硫酸デキストラン、100 μ g/ml salmon sperm DNA) 中にて 45 $^{\circ}$ C で数時間行った後、ハイブリダイゼーションを ³²P で標識した PrPLP/Dpl プローブ (BcaBEST Labelling Kit, TaKaRa) を混入し一昼夜行った。洗いは、2 \times SSC / 0.1% SDS で室温 10 分を 2 回、1 \times SSC / 0.1% SDS で 65 $^{\circ}$ C 15 分を 1 回、さらに 0.1 \times SSC / 0.1% SDS で 65 $^{\circ}$ C 15 分を 2 回行った。シグナルは、X 線フィルム (Konica) に感光して検出した。

3) ウェスタンブロットング法

マウス脳を 50mM Tris-HCl, pH 7.5/150mM NaCl/0.5% sodium deoxycholate/0.5% Triton X-100 にて乳剤化し、総蛋白 75 μ g を Laemmli 緩衝液下で熱処理し 12% SDS-アクリルアミドゲルにて電気泳動した後、ニトロセルロース膜にトランスファーした。proteinase K (20 μ g/ml) 処理は 37 $^{\circ}$ C にて 30 分間行った。5% ミルクを含む 20mM Tris-HCl, pH 7.6/137mM NaCl//0.1% Tween 20 (TBST) にてブロッキングを 1 時間行い、1% ミルクを含む TBST にて一次抗体 (レコンビナント PrP に抗ウサギ血清、1 : 5000) を 4 $^{\circ}$ C にて一昼夜行った。TBST で洗浄後、二次抗体 (ペルオキシダーゼ結合抗ウサギ IgG ヤギ血清、1 : 5000, Amersham) を 1% ミルクを含む TBST 中にて反応させた。さらに TBST で洗浄後、ECL (Amersham) にて PrP を検出した。

4) ヘマトキシリン・エオジン (H・E) 染色

感染マウス脳を 4%パラホルムアルデヒドにて固定した後、パラフィンにて包埋し、5 μ m 厚の切片を作製した。脱パラしたのち、常法に従い H・E 染色を行った。

(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。

〔結果と考察〕

Ngsk *Prnp*^{0/0} マウスは老齢になるとプルキンエ細胞の変性死を呈するが、Zrch *Prnp*^{0/0} マウスは神経学的異常を呈さない^{5, 6)}。また、Ngsk *Prnp*^{0/0} マウスの脳内ではプルキンエ細胞をはじめほとんど全ての神経細胞に PrPLP/Dpl 遺伝子の異所性過剰発現が認められるが、Zrch *Prnp*^{0/0} マウスでは正常マウスと同様に発現が検出されなかった²⁾。このことは、PrPLP/Dpl の異所性過剰発現がプルキンエ細胞変性死に関与していることを示唆した。そこで、プリオン病に認められる神経細胞変性死にも PrPLP/Dpl の過剰発現が関与しているか検討した。プリオン感染発症 ddY マウスと PBS を脳内接種した ddY マウスの脳からそれぞれ RNA を抽出し、ノーザンブロットングを行った。その結果、図 1 に示すように、Ngsk *Prnp*^{0/0} マウスで認められた PrPLP/Dpl の過剰発現は、コントロール (PBS 接種) マウスと野性型 (*Prnp*^{+/+}) マウスと同様に、プリオン感染マウス脳でも検出できなかった。これらの結果は、プリオン感染によって PrPLP/Dpl の発現は誘導されないことを示し、正常マウスにおけるプリオン病の病態には PrPLP/Dpl は関与していないことを示した。しかし、未同定である別の PrP 類似蛋白がプリオン病の神経細胞変性死に関与している可能性はまだ残されている。

プリオン病罹患脳内では外来性のプリオン (PrP^{Sc}) が正常組織に発現している正常型 PrP (PrP^C) をプリオン (PrP^{Sc}) へ構造変化させることによって、プリオン (PrP^{Sc}) の蓄積が起こっていると考えられている。この PrP の構造変化が、プリオン病の病態およびプリオンの複製の主要な分子機構である。Flechsigs らは、この構造変化に PrP の N 末に存在する銅結合領域である octapeptide repeat は必要ないことを報告した⁷⁾。また Supattapone らは、N 末と C 末領域内のアミノ酸 141-176 を欠損する変異 PrP (PrP106) を発現するトランスジェニックマウスは、プリオン接種後コントロールと比べて非常に短い潜伏期間を呈したことを報告した⁸⁾。これは、外来性の PrP^{Sc} が PrP^C を PrP^{Sc} に変換させると時に、PrP106 も構造変化を起こし異常型 PrP106 と変化し、接種されたプリオン (PrP^{Sc}) とは性質を異にする新規の“PrP106 プリオン”が産生されたためであると考えられた⁸⁾。PrP の C 末と高い構造類似性を呈する PrPLP/Dpl が、PrP の構造変化を促進または抑制できるのか、それとも PrPLP/Dpl 自体が構造変化し“PrPLP/Dpl プリオン”を産生するのか興味深い。

まず、PrPLP/Dpl と PrP の双方を発現している Ngsk *Prnp*^{0/+} マウスと PrP のみを発現している Zrch *Prnp*^{0/+} マウスに、福岡-1 プリオン株を感染させ、両者の潜伏期間、病理学的変化、および PrP^{Sc} の蓄積について比較検討を行い、PrPLP/Dpl が PrP の構造変化を促進または抑制できるのか調べた。その結果、Ngsk *Prnp*^{0/+} と Zrch *Prnp*^{0/+} マウスはそれぞれ 282 \pm 23 日と 286 \pm 27 日に全て発症し死亡し (表 1)、有意な潜伏期間の違いを示さなかった。また、それぞれの発症マウス脳の H・E 染色による検索では、両者とも大脳皮質及び海馬領域に同様な著しい空砲変性が認められた (図 2a)。抗 GFAP 抗体を用いた免疫組織化学的検索にても、空砲変性が認められた場所に同程度のアストロサイトの蓄積が認められた (data not shown)。さらに、両者の脳には大量の PrP^{Sc} の蓄積も認められ、それらの糖鎖結合パターンは同じであった (図 2b)。これらの結果は、PrPLP/Dpl はプリオン病を促進も抑制もしない可能性を強く示唆した。しかし、Ngsk *Prnp*^{0/+} マウス脳における PrPLP/Dpl の発現は PrP と比べて非常に低いので、PrPLP/Dpl を大量に発現し検討する必要があるかもしれない。

次に、PrPLP/Dpl と PrP を発現している *Ngsk Prnp^{0/1}* マウス脳内に新規の “PrPLP/Dpl プリオン” が産生されているか検討した。プリオン病発症 *Ngsk Prnp^{0/+}* マウス脳乳剤を *Ngsk Prnp^{+/-}*、*Ngsk Prnp^{0/+}*、*Ngsk Prnp^{0/0}* マウスに脳内接種し潜伏期間を調べた。その結果、*Ngsk Prnp^{+/-}* と *Ngsk Prnp^{0/+}* マウスはそれぞれ 161±11 日と 296±12 日に全て発症し死亡した (表 1)。さらに、PrPLP/Dpl のみを発現する *Ngsk Prnp^{0/0}* マウスは、接種後 415 日以上たった現在でも発症していない (表 1)。このことは、潜伏期間が PrP^C の発現量によってのみ規定され PrPLP/Dpl の発現によって影響されないことを示しており、*Ngsk Prnp^{0/0}* マウス脳内での “PrPLP/Dpl プリオン” の産生は否定的であることを示した。

【結 論】

PrPLP/Dpl は、プリオン病の病態に関与していない。

【参考文献】

- 1) Li A., Sakaguchi S., Shigematsu K., Atarashi R., Roy B-C., Nakaoke R., Arima K., Okimura N., Kopacek J., Katamine K.: Physiological expression of the gene for PrP-like protein, PrPLP/Dpl, by brain endothelial cells and its ectopic expression in neurons of PrP-deficient mice ataxic to Purkinje cell degeneration. *American Journal of Pathology*. 157: 1447-1452, 2000
- 2) Li A., Sakaguchi S., Atarashi R., Roy B-C., Nakaoke R., Arima K., Okimura N., Kopacek J., 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. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 20: 553-567, 2000
- 3) Silverman G. L., Qin K., Moore R. C., Yang Y., Mastrangelo P., Tremblay P., Prusiner S. B., Cohen F. E., Westaway D.: Doppel is an N-glycosylated, GPI-anchored protein: expression in testis and ectopic production in the brains of *Prnp0/0* mice predisposed to Purkinje cell loss. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 26834-41, 2000
- 4) Moore R. C., Lee I. Y., Silvermann 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., Katamine S., Carlson G. A., Cohen F. E., Prusiner S. B., Melton D. W., Tremblay P., Hood L. E., Westaway D.: Ataxia in prion protein (PrP) deficient mice associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *Journal of Molecular Biology*. 294: 797-817, 1999
- 5) 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., Noda T.: Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted *PrP* gene. *Nature*. 380: 528-531, 1996
- 6) Bueler H., Fischer M., Lang Y., Bluethmann H., Lipp H-P., DeArmond S. J., Prusiner S. B., Aguet M., Weissmann C.: Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*. 356: 577-582, 1992
- 7) Flechsig E., Shmerling D., Hegyi I., Raeber A. J., Fischer M., Cozzio A., von Mering C., Aguzzi A., Weissmann C.: Prion protein devoid of the octapeptide repeat region restores susceptibility to scrapie in PrP knockout mice. *Neuron*. 27: 399-408, 2000
- 8) Supattapone S., Bosque P., Muramoto T., Wille H., Aagaard C., Peretz D., Nguyen H-O. B., Heinrich C., Torchia M., Safar J., Cohen F. E., DeArmond S. J., Prusiner S. B., Scott M.: Prion protein of 106 residues creates an artificial transmission barrier for prion replication in transgenic mice. *Cell*. 96: 869-878, 1999

【研究発表】

1. 論文発表

- 1) Kopacek J., Sakaguchi S., Shigematsu K., Nishida N., Atarashi R., Nakaoke 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
- 2) Satoh J., Kuroda Y., Katamine S.: Gene expression profile in prion protein-deficient fibroblasts in culture. *Am. J. Pathol.* 157: 59-68, 2000
 - 3) Nakaoka R., Sakaguchi S., Atarashi R., Nishida N., Arima K., Shigematsu K. and Katamine S.: Early appearance but lagged accumulation of detergent-insoluble prion protein in the brains of mice inoculated with a mouse-adapted Creutzfeldt-Jakob disease agent. *Cel. Mol. Neurobiol.* 20: 717-730, 2000
 - 4) Li A., Sakaguchi S., Shigematsu K., Atarashi R., Roy B.C., Nakaoka R., Arima K., Okimura N., Kopacek J., and Katamine S.: Physiological expression of the gene for PrP-like protein, PrPLP/Dpl, by brain endothelial cells and its ectopic expression in neurons of the PrP deficient mice ataxic due to Purkinje cell degeneration. *Am. J. Pathol.* 157: 1447-1452, 2000
 - 5) Milhavel O., McMahon H.E., Rachidi W., Nishida N., Katamine S., Mange A., Arlotto M., Casanova D., Riondel J., Favier A., and Lehman, S.: Prion infection impairs the cellular response to oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 13937-13942, 2000
 - 6) Deli M.A., Sakaguchi S., Nakaoka R., Abraham C.S., Takahata H., Kopacek J., Shigematsu K., Katamine S. and Niwa M.: Prion protein fragment 106-126 is toxic to cerebral endothelial cells expressing cellular prion protein. *NeuroReport* 11: 3931-3936, 2000

2.学会発表

- 1) 坂口末廣、李愛民、新竜一郎、中桶了太、有馬和彦、白木洋、片峰茂：感染性プリオン蛋白逆変換活性を有するペプチドの同定。日本ウイルス学会第48回学術集会、三重県津市、2000年10月
- 2) 新竜一郎、坂口末廣、中桶了太、有馬和彦、片峰茂：プリオン蛋白欠損マウスにおけるグリア細胞の活性化。日本ウイルス学会第48回学術集会、三重県津市、2000年10月

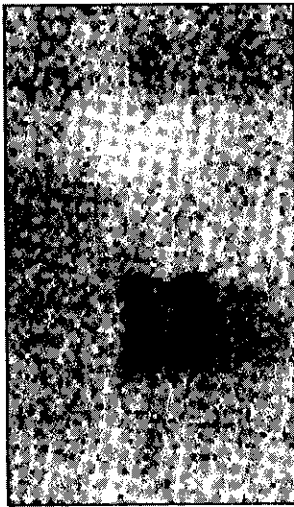
〔知的所有権の取得状況〕

なし

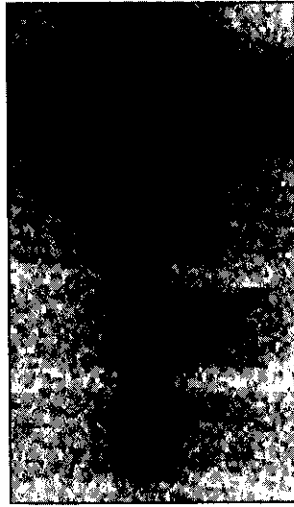
表1 プリオン病に及すPrPLP/Dpl遺伝子発現の影響

Inocula	Host	Gene expression		Incubation time (days)	Diseased/ Inoculated mice
		PrPLP/Dpl	PrP		
Ngsk <i>Prnp</i> ^{+/+}	Ngsk <i>Prnp</i> ^{0/+}	+	+	282.3 ± 22.5	5/5
	Zrch <i>Prnp</i> ^{0/+}	-	+	286.4 ± 27.0	5/5
Ngsk <i>Prnp</i> ^{0/+}	Ngsk <i>Prnp</i> ^{+/+}	-	++	161.4 ± 10.9	7/7
	Ngsk <i>Prnp</i> ^{0/+}	+	+	296.3 ± 12.1	8/8
	Ngsk <i>Prnp</i> ^{0/0}	++	-	>415	0/5

1 2 3 4



**PrPLP/
Dpl**



GFAP

図1：プリオン感染マウス脳におけるPrPLP/Dplの遺伝子発現。Ngsk Prionop^{0/0}マウス (レーン2) では2.4と3.4kbのPrPLP/Dpl mRNA発現が認められるが、野生型 (Prionop^{+/+}) マウス (レーン1)、PBSを接種したコントロールマウス (レーン3)、およびプリオン感染マウス (レーン4) ではPrPLP/Dplの発現は認められない。プリオン感染マウス (レーン4) ではGFAP遺伝子の過剰発現が認められる。

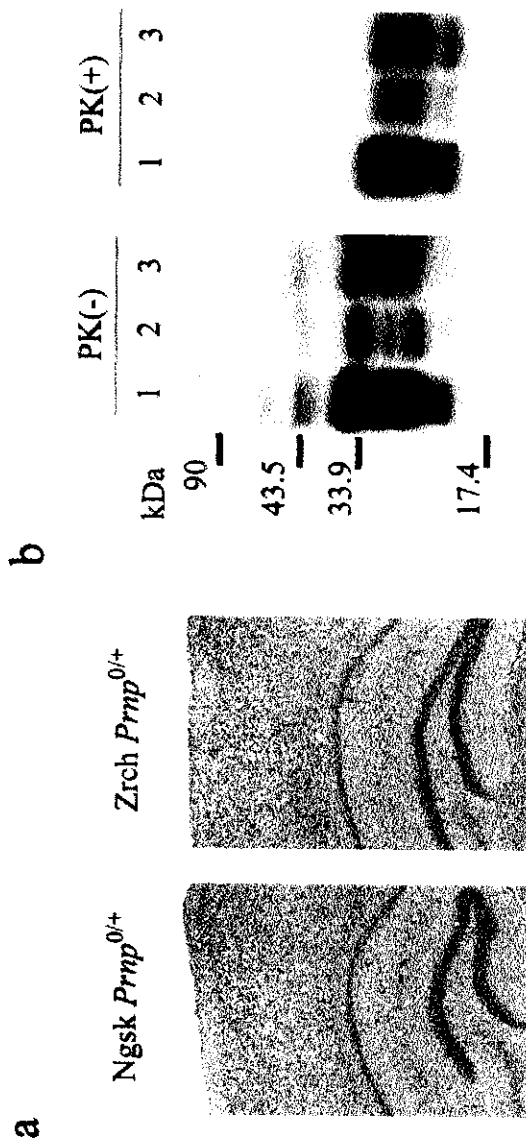


図2 a : フリオン病発症Ngsk *Pmp*^{0/+}とZrch *Pmp*^{0/+}マウスの脳組織のH・E染色。
b : フリオン病発症マウス脳のウェスタンブロットイング。1 : 野生型 (*Pmp*^{+/+}) マウス、
2 : Ngsk *Pmp*^{0/+}マウス、3 : Zrch *Pmp*^{0/+}マウス、PK : proteinase K。

遺伝性プリオン病のマウスへの伝播実験

班 員：立石 潤（老人保健施設・春風・Brain Research Laboratory）
班 員：毛利 資郎（九州大学・大学院医・実験動物施設）
班 員：北本 哲之（東北大学・大学院医・病態神経）

【研究要旨】

プリオン蛋白遺伝子の変異を伴う遺伝性プリオン病のマウスへの伝播実験を、未発表の症例を加えて検討した。遺伝性変異の種類に応じて伝播成績に差があり、容易に伝播されるものには D178N, E200K, M232R があり、過剰反復挿入変異や P105L, A117V, Y145Stop, V180I は困難で、P102L はその中間であった。伝播され易い症例ではホルマリン固定脳からも伝播され、その強い感染性と不活化の困難さを示すものといえよう。

Experimental transmission of hereditary prion diseases to mice

Jun TATEISHI¹, Shirou MOHRI², Tetsuyuki KITAMOTO³

¹ Brain Research Laboratory, Geriatric Health Care Facilities, Harukaze

² Laboratory Animal Center, Kyushu University Graduate School of Medicine

³ Department of Neurological Science, Tohoku University Graduate School of Medicine

ABSTRACT

Hereditary prion diseases were transmitted to mice from patients with gene mutations of prion protein (PrP). D178L, E 200K and M232R were most easily transmitted to NZW mice, while insertion mutations of octapeptide, P105L, A117V, Y145Stop and V180I were not transmitted. P102L was with intermediate difficulty. Formalin-fixed patient's Brains with E200K or M232R also transmitted spongiform encephalopathy to mice. These facts suggest that some hereditary prion diseases are very infectious and the pathogens are resistant for inactivation.

【はじめに】

牛海綿状脳症（BSE）や硬膜移植後クロイツフェルト・ヤコブ病（硬膜 CJD）などの感染性プリオン病が最近問題になっているが、遺伝性プリオン病も実験動物に伝播することを明らかにしてきた¹⁾。最近終了した実験成績を含めて、これ迄の伝播実験をまとめる。

【材料と方法】

剖検症例の凍結保存脳を生理的食塩水または磷酸緩衝食塩水で 10% 乳剤として、NZW 系マウスの脳内に 0.02ml ずつ注入した。また E200K と M232R 変異を持つ各 1 症例のホルマリン固定脳切片と D178N を実験的に伝播した初代マウスのホルマリン固定脳を水洗後 10% 乳剤を作成し同様に接種した。長期間飼育したマウスは発病を確認後または老化による死亡の前後に解剖し、免疫染色を含む病理検索を全例に施行した。

（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】

1. D178N の変異アレルに 129M を合併する致死性家族性不眠症(FFI)の米国人症例からの伝播成績はさきに発表した²⁾。今回は本邦初例³⁾の凍結脳を用い表1の如き成績を得た。これは米国症例の場合のマウス発病率(15/18)と潜伏期間(455±35 日)とほぼ同様であった。さらに発病マウスの病変も同様に視床にほぼ限局した海綿状態とグリオーシスを認め、免疫組織化学的に PrP^{Sc} も視床に限局していた。この初代伝播マウスの凍結脳およびホルマリン固定液に約 6 カ月間保存した脳の乳剤を接種した継代マウスは、ほぼ全部が発病した(表1)。その潜伏期間は散発性 CJD 症例からの継代マウスに比し、短縮傾向は少なく、さらにホルマリン固定脳接種群は凍結脳接種群より約 90 日遅れて発症した。継代マウスの病変も視床に限局する傾向を示したが、初代マウスに比しやや広く、頭頂葉を中心とした大脳皮質への拡がりを示した。

2. E200K を持つ北九州の症例からの伝播成績はさきに発表した⁴⁾。今回は島根県の家系⁵⁾の剖検例で、約 10 年間ホルマリン固定中の脳を用いた。その成績は表1に示す如くで、北九州症例の凍結脳からのマウス発病率(12/13)に比しやや低く、その潜伏期間(649±81 日)に比し 150 日の延長を認めた。発病マウスの病変は凍結脳接種マウスと同様で、多くの散発性 CJD を接種したマウスと大差はみられなかった。

3. M232R 症例⁶⁾の伝播実験も約 5 カ月間ホルマリンに固定された脳切片を用いて行った。その伝播成績(表1)は、さきに報告した凍結脳を用いた 2 症例からの伝播成績⁶⁾(マウス発病率は各々 15/24 と 8/13、潜伏期間は 657±67 日、725±56 日)に比し、発病率はやや低く、潜伏期間は約 80 日、145 日の延長を認めた。

4. プリオン蛋白の N 末端側の 8 アミノ酸反復部位に、さらに 6 反復(144 塩基対)の過剰挿入をみた家系⁷⁾の 1 症例の未固定脳乳剤を脳内接種した 11 匹のマウスは接種後 455~1117 日間観察した後全例の病理標本を作成し、免疫組織化学的に検索したが、病変はみとめられなかった。

5. 以上の伝播成績を加えて、我々の行ったすべての遺伝性プリオン病の伝播成績をまとめると表2の如くなる。

【考察】

遺伝性プリオン病では、遺伝子異常の種類により実験的伝播に難易が認められた。野生型 NZW マウスにもっとも伝播しやすい D178N, E200K, M232R の 3 変異と、接種を試みた 16 症例中の 6 症例から伝播が成立した P102L は、わが国に比較的多い遺伝性病型である。とくに地域的集団発生が報ぜられた E200K と日本以外には症例報告がみられない M232R は、今回ホルマリン固定脳からも伝播が成立した点で、防疫上、十分な注意が必要であろう。一方わが国にのみ報告のみられる V180I 変異を持つ 3 症例からは、実験的伝播は起こらず、その 1 例は伝播の起こり易い M232R を合併した症例⁸⁾であった。したがって V180I の合併が M232R によるプリオン病の伝播を阻止した可能性もある。さらに散発性 CJD 症例には存在しないため、発病阻止効果を持つといわれる 219K 多型⁹⁾が同一アレルに合併した P102L の唯一の報告例¹⁰⁾からの伝播は起こらなかった。今後ヒト型遺伝子を導入したマウスを用いた伝播実験が必要となろう。

【結論】

わが国から報告された遺伝性プリオン病の殆どすべての病型について、野生型マウスへの伝播実験を終了した。そのうち D178N, E200K, M232R を持つ症例からマウスへの伝播は起こり易く、ホルマリン固定脳からも伝播は成立した。P102L は 16 接種症例中の 6 例に伝播が証明されたが、P105L, A117V, Y145Stop, V180I や過剰反復挿入変異を持つ遺伝性症例から野生型マウスへの伝播は起こらなかった。

[参考文献]

- 1) Tateishi J., Kitamoto T., Hoque MZ., Furukawa H.: Experimental transmission of Creutzfeldt-Jakob disease and related diseases to rodents. *Neurology*. 46: 532-537, 1996
- 2) Tateishi J., Brown P., Kitamoto T., Hoque MZ., Roos R., Wollman R., Cervenáková L., Gajdusek DC.: First experimental transmission of fatal familial insomnia. *Nature*. 376: 434-435, 1995
- 3) Nagayama M., Shinohara Y., Furukawa H., Kitamoto T.: Fatal familial insomnia with a mutation at codon 178 of the prion protein gene: first report from Japan. *Neurology*. 47: 1313-1316, 1996
- 4) Inoue I., Kitamoto T., Doh-ura K., Shii H., Goto I., Tateishi J.: Japanese family with Creutzfeldt-Jakob disease with codon 200 point mutation of the prion protein gene. *Neurology*. 44: 299-301, 1994
- 5) Seno H., Tashiro H., Ishino H., Inagaki T., Nagasaki M., Morikawa S.: New haplotype of familial Creutzfeldt-Jakob disease with a codon 200 mutation and a codon 219 polymorphism of the prion protein gene in a Japanese family. *Acta Neuropathol*. 99: 125-130, 2000
- 6) Hoque MZ., Kitamoto T., Furukawa H., Muramoto T., Tateishi J.: Mutation in the prion protein gene at codon 232 in Japanese patients with Creutzfeldt-Jakob disease: a clinico-pathological, immunohistochemical and transmission study. *Acta Neuropathol*. 92: 441-446, 1996
- 7) Oda T., Kitamoto T., Tateishi J., Mitsuharu T., Iwabuchi K., Haga C., Oguni E., Kato Y., Tominaga I., Yanai K., Kashima H., Kogure K., Ogino K.: Prion disease with 144 base pair insertion in a Japanese family line. *Acta Neuropathol*. 90: 80-86, 1995
- 8) Hitoshi S., Nagura H., Yamanouchi H., Kitamoto T.: Double mutation at codon 180 and 232 of the PRNP gene in an apparently sporadic case of Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Neurol. Sci*. 120: 208-212, 1993
- 9) Shibuya S., Higuchi J., Shin R-W., Tateishi J., Kitamoto T.: Codon 219 Lys allele of PRNP is not found in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol*. 43: 826-828, 1998
- 10) Furukawa H., Kitamoto T., Tanaka Y., Tateishi J.: New variant prion protein in a Japanese family with Gerstmann-Sträussler syndrome. *Mol. Brain Res*. 30: 385-388, 1995

[研究発表]

- 1) Majtényi C, Brown P, Cervenáková L, Goldfarb LG, Tateishi J: A three-sister sibship of Gerstmann-Sträussler-scheinker disease with a CJD phenotype. *Neurology*. 54: 2133-2137, 2000
- 2) 立石 潤 : 日本のプリオン病研究. *Dementia Japan*. 11: 25-32, 2000

表1 遺伝性プリオン病の伝播実験 - 追加

接種材料	発病マウス数/ 接種マウス数	潜伏期間 M±SD 日
D178N 症例 凍結脳	15/19	527±76
発病マウス (初代) 凍結脳	15/16	357±28
発病マウス (初代) ホルマリン固定脳	19/19	447±18
E200K 症例 ホルマリン固定脳	6/8	799±45
M232R 症例 ホルマリン固定脳	4/10	802±81
6 過剰反復挿入症例 凍結脳	0/11	

表2 遺伝性プリオン病の伝播実験 - まとめ

プリオン蛋白遺伝子変異	症例数	伝播陽性	伝播陰性
P102L	16	6	10
+219K	1		1
P105L+129V	2		2
A117V+129V	1		1
Y145Stop	1		1
D178N+129M	2	2	
V180I	1		1
+129V	1		1
+M232R	1		1
E200K	2	2	
M232R	3	3	
Insertion +96bp	1		1
+144bp	1		1
+168bp	1		1
Deletion -24bp	1		1

プリオン蛋白(PrP)遺伝子操作マウスの作製

班 員：三好 一郎（東北大学・大学院医・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】

マウスプリオンタンパク(PrP)を高発現するトランスジェニックマウスを作製し、伝播実験を行った。正常に比較して 1.1 および 2.0 倍のマウス PrP を発現したトランスジェニックマウス(TgMo#39 及び#22)は、各々 154 日および 107 日の潜伏期間を示し、コントロール(163 日)よりも発症が早かった。このことから、導入遺伝子由来マウス PrP の発現により総 PrP 量が増加してプリオン接種後の潜伏期間が短縮されることが示された。また、多コピーの導入遺伝子が確認されたファウンダーマウスが、これまで作製した種々の PrP 遺伝子導入マウスに見られる運動失調、及び、後肢の麻痺等の過剰発現症状に類似した表現系を呈したことから、これらの症状は種差に依存しない正常 PrP の過剰発現に起因することが示唆された。

一方、孤発性 CJD 発症の防御因子と考えられる多型 219 Glu→Lys 変異を導入したノックインマウスの作製も試みている。

Production of mice carrying mutated prion protein gene by transgenic and gene-targeting technology

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

We established transgenic mice (TgMo) by introduction of mouse prion protein (PrP) gene construct. The relative expression levels of mouse PrP were 1.1 times (TgMo#39) and 2.0 times (TgMo#22), compared with wild-type mouse. Incubation periods of the TgMo mice inoculated with Fukuoka-1 strain were 154 days (TgMo#39) and 107 days (TgMo#22) respectively, and shorter than those of wild-type mouse (163 days). It suggests that the susceptibility of the TgMo mice to prion is enhanced depending on the expression of mouse PrP derived from both the transgene and endogenous PrP gene. One of founder mice, which carried a high copy number of the transgene, exhibited similar phenotype such as abnormal gait, emaciation and consequential paralysis of hind limb to those observed in other modified PrP transgenic mice. This phenotype may be caused by overexpression of PrP with normal function conserved among various species.

【はじめに】

これまで我々は、プロセッシング及び局在性、安定性、他の分子との相互作用に関与すると考えられる領域、更に種間の相違を考慮して構造を改変した PrP 遺伝子導入トランスジェニックマウスを作製

し、伝播実験等に有用なヒト/マウスキメラ型 PrP を発現するマウスを確立した。一方では導入遺伝子の種類に関わらず、我々が作製したほぼ全ての PrP 高発現マウスで運動失調や後肢麻痺などの類似症状が観察されている。今回、従来の研究の対照として、さらに PrP 発現量と伝播・発症の問題に焦点を当てて、マウス PrP を発現するトランスジェニックマウスを作製し、感受性を調べた。

【方 法】

平成 8 年度の本研究班で報告した方法に準じてマウス野生型 PrP 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス（以下 TgMo）を作製し(Table 1)¹⁾、主に C57BL/6 に交配して得られた F1 世代を以降の実験に用いた。TgMo マウスの PrP の発現とその量を比較するために、可溶化した脳総膜画分(50 μ g タンパク)を SDS-PAGE(15%)で分離した後、ウェスタンブロッティングを行った。1 次抗体は、エジンバラ NPU より分与されたウサギ抗ヒツジスクレイピーポリクローナル抗体を、また、2 次抗体として抗ウサギ IgG Alkaline phosphatase conjugate (Promega)を用い、NBT/PCIB システムで発色させた。感染実験では、マウス順化プリオン病病原因子、福岡 1 株の 10%脳乳剤 20 μ l をマウスの脳内に接種した。

ノックインマウスの作製には、マウス PrP 遺伝子 exon3 の SmaI サイト以降を 219 Glu \rightarrow Lys 変異を含むヒト型に置換したターゲティングベクターを用いた。このベクターには、ポジティブセレクションとして 3'-untranslated region の Apa I サイトに loxP-PGKneo-loxP が導入され、一方ネガティブセレクションとして 3 側末端に DTA 遺伝子が導入してある(Fig 1)²⁾。エレクトロポレーション法でこのベクターを AB2.2 ES 細胞に導入後 G418 で選択し、相同組み替え体を解析した。

（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】

導入遺伝子を持つ 5 匹のファウンダーマウスが得られ、そのうち TgMo#22 及び#39、#61 が系統化された。サザンブロッティングにより解析したところ、導入遺伝子の数は#61>#22>#39 であった。また、発現しているマウス PrP は内在性 PrP 遺伝子と導入遺伝子に由来するが、正常マウスに比較して、約 2.0 倍(#22)、および、1.1 倍(#39)、2.2 倍(#61)であった(Table 2 及び Fig 2)。

これらの内、#22 と#39 にプリオン接種による感受性実験を行った。コントロール(163 日)に比較し、107 日(#22)および 154 日(#39)と平均潜伏期間が短縮され、発現する PrP の量に依存して感受性が上がる可能性が示された(Table 2)。内在性マウス PrP を持たず、ヒト/マウスキメラ PrP のみを発現するトランスジェニックマウスではヒトプリオンに対する感受性が上がるが、発現量が過剰になると逆にその量に比例して低感受性になることが知られている³⁾。今回の TgMo マウスでは、その発現量は増加したが“過剰”までには至らなかったことも推測される。

一方、最も多コピーの導入遺伝子が検出された#53 は、生後 2 ヶ月で運動失調や後肢麻痺などの症状を示した。これまで我々が作製したキメラ型あるいは（狭義の）変異導入型 PrP 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスが、その由来種（ヒト、あるいはマウス、ウシ、ヒツジ）に関わらず高発現に伴って運動失調や後肢麻痺などの類似症状を呈すことを報告してきた(Table 1)^{4),5)}。また、ヒト/マウスキメラ型 PrP は、KO マウスの PrP 遺伝子欠損による運動失調を代償する⁶⁾。今回、マウス正常 PrP も高発現により同様の表現系を導くことから、この過剰発現症状は種を越えて保存された PrP の機能に由来することが示唆された。

ノックインマウスの作製では、DNA 解析の結果 180 クローンから 4 クローンの相同組み替え体が得られた。現在、キメラマウスを作製中である。

【結 論】

正常マウスプリオンタンパク(PrP)遺伝子の導入により、TgMo トランスジェニックマウスを作製した。マウス PrP の発現量に依存して、プリオンに対する感受性が高くなったが、一方では、多コピーの遺伝子導入で過剰発現症状が観察された。

【参考文献】

- 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) 中村健司, 中尾和貴, 勝木元也, 北本哲之: 実験動物におけるヒト遺伝子発現系の開発。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: 25-28, 1997.
- 3) 毛利資郎, 北本哲之, 三好一郎, 石川有紀子, 大野彰子, 沼野純: ヒト PrP 遺伝子発現マウスのプリオン感受性試験(その3)。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11年度研究報告書: 88-93, 2000.
- 4) 三好一郎, 北本哲之: プリオン蛋白過剰発現マウスの臨床と病理。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9年度研究報告書: 19-23, 1998.
- 5) 三好一郎, 北本哲之, 村本環, 笠井憲雪, 埜中征哉: 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: 84-86, 1999.
- 6) 三好一郎, 北本哲之, 毛利資郎, 村本環, 石川有紀子: 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。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11年度研究報告書: 83-87, 2000.

【研究発表】

1. 論文発表
 2. 学会発表
- 1) 毛利資郎, 三好一郎, 笠井憲雪, 北本哲之: ヒトプリオン病モデルマウス。第130回日本獣医学会学術集会, 大阪, 2000 (ワークショップ「脳神経疾患モデル動物」)