

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

プリオン病関連遺伝子の構造・機能の解明と

診断・治療への応用

～プリオン類似蛋白遺伝子と疾患感受性遺伝子～

平成13年度 総括・分担研究報告書

平成 14 年 3 月

主任研究者 片 峰 茂

はじめに

平成13年度の「プリオン病関連遺伝子の構造・機能の解明と診断・治療への応用
～プリオン類似蛋白遺伝子と疾患感受性遺伝子～」の研究報告を公表する

平成14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. プリオン蛋白類似蛋白 (PrPLP) による 神経細胞変性死の分子機構	9
長崎大・院医・感染分子病態	片 峰 茂
2. 特発性プリオン病の疾患感受性因子の研究	16
九州大・院医・脳研病理	堂 浦 克 美
3. 異常型プリオン蛋白質特異的分子プローブの作製	21
帯広畜産大・原虫研・獣医公衆衛生	堀 内 基 広
研究成果の刊行に関する一覧表	29
研究成果の刊行物・別刷	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	長崎大学大学院 医学研究科 感染分子病態学講座	教 授	T 095-849-7057 F 095-849-7060
分担研究者	堂浦 克美	九州大学大学院 医学系研究院 脳神経病研究施設	助教授	T 092-642-5537 F 092-642-5540
分担研究者	堀内 基広	帯広畜産大学 原虫病研究センター 獣医学科 獣医公衆衛生学	助教授	T 0155-49-5392 F 0155-49-5402

總 括 研 究 報 告

総括研究報告

〔研究課題名〕

プリオン病関連遺伝子の構造・機能の解明と診断・治療への応用
～プリオン類似蛋白遺伝子と疾患感受性遺伝子～

〔主任研究者氏名〕

片 峰 茂 (長崎大・院医・教授)

〔研究要旨〕

プリオン病関連遺伝子（疾患感受性遺伝子とプリオン類似蛋白遺伝子）の構造・機能を解明し、診断治療法の開発に資することを目的に研究を行い以下の成果を得た。(1) プリオン類似蛋白PrPLP/Dplが脳血管あるいは血液脳関門形成に機能すること、及びその神経細胞での異所性発現が神経変性に関与することを示唆する成績を得た。また解析ツールとして神経細胞全般あるいはプルキンエ細胞特異的にPrPLP/Dplを過剰発現するTgマウスを作製した。(2) 特発性プリオン病の疾患感受性因子の候補として補体系蛋白の遺伝子多型を、少数例の特発性ヤコブ病患者と対照群において解析した。これまでに検索した中では、CR1に複数のアミノ酸置換を伴う多型とC1q BPにイントロン部の多型が確認された。(3) 異常プリオン蛋白(PrP^{Sc})に対する34のモノクローナル抗体(mAb)を樹立した。そのうちmAb6H10は、PrP^{Sc}凝集体上に存在するPrP^{Sc}特異的非連続エピトープを認識することが示唆された。

〔分担研究者氏名〕

堂 浦 克 美 (九州大・院医・助教授)

堀 内 基 広 (帯広畜産大・原虫研・助教授)

〔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はプリオン蛋白(PrP)の正常から異常への立体構造変換に起因することが明らかになっている。しかし遺伝的背景の異なる個体においてはプリオンに対する感受性や病理像に違いがあることが判っており、PrP遺伝子それ自身の多型性に加えて既知あるいは未知の幾つかの遺伝子が疾患感受性に関与するものと考えられる。一方、我々は最近、プリオン類似蛋白(PrPLP/Dpl)をコードする遺伝子の存在を明らかにした。この

新規遺伝子はPrP遺伝子の下流16 kbに存在する。このことはこのゲノム領域に未特定の遺伝子を含めて複数の類似遺伝子が存在する可能性を示唆している。PrPLP/Dpl は構造の類似性からPrPとの機能的関連が予想され、またプリオン病病態に影響を及ぼす可能性が強い。本研究はこれらプリオン病関連遺伝子（疾患感受性遺伝子とプリオン類似蛋白遺伝子）の構造・機能を解明し、診断治療法の開発に資することを目的とする。具体的には以下のことを達成する。

- (1) 遺伝子改変マウスを用いてDpl/PrPLPの生理機能を解明する。
- (2) 遺伝子改変マウスを用いてDpl/PrPLPのプリオン複製、プリオン病病態に及ぼす影響を解明する。
- (3) PrP遺伝子に隣接するゲノム領域をゲノムデータベースに基づき広範に構造解析することにより新規プリオン関連遺伝子を同定する。
- (4) 集積した臨床（CJDを割愛）検体を用いて疾患感受性に関わるPrP遺伝子の新たな多型を解明する。
- (5) 同様に一連の補体関連遺伝子の多型と疾患感受性の関連を解明する。
- (6) 異常PrPに付随（結合）する分子を同定し、その機能及び遺伝子多型と疾患感受性の関連を解明する。
- (7) プリオン感受性及び非感受性培養細胞の遺伝子発現様式の違いに基づき疾患感受性遺伝子を同定する。

今年度は、(1) Dpl/PrPLPによる神経変性死の分子機構の解析、(2) 特発性プリオン病の疾患感受性因子としての補体系分子の検索、及び(3) 異常型プリオン蛋白質特異的分子プローブの作製、を行ったので報告する。

〔研究方法〕

(1) Dpl/PrPLPによる神経変性死の分子機構の解析

PrPLPの過剰発現がある系統のPrP欠損 (*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かどうかを検討した。まず、正常マウスと*Ngsk Prnp^{0/0}* マウスの脳でのPrPLP発現様式および発現細胞の比較検討を行った。次に、小脳プルキンエ細胞変性死が起らない*Zrch Prnp^{0/0}*マウスにPrPLPを過剰発現するようにPrPLP遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (Tgマウス) を作製し、小脳プルキンエ細胞変性死が起こるかどうか検討することにした。ハムスターPrPをneuron-specific enolase (NSE)プロモーターの下流に挿入したNSE-HPrPプラスミド (Chesebro博士より分与) からハムスターPrP遺伝子を除き、Hind IIIサイトにPrPLP遺伝子の翻訳領域を挿入したNSE-PrPLPプラスミド作製した。また、プルキンエ細胞特異的に発現するPurkinje cell protein (PCP)-2遺伝子のプロモーターを有するPCP2SプラスミドのSal Iサイトに、PrPLP遺伝子の翻訳領域を挿入したPCP2-

PrPLPプラスミド作製した。それぞれのプラスミドからNSE-PrPLPとPCP2-PrPLPを精製し、C57BL/6マウスの受精卵に注入し、Tgマウスを作製した。

(2) 特発性プリオン病の疾患感受性因子としての補体系分子の検索

補体系蛋白は遺伝性プリオン病罹患脳に見られるプリオン蛋白アミロイド斑に共存するなどプリオン蛋白との関連が示唆されている。また、補体の古典的経路の蛋白であるC1qをノック・アウトしたマウス、あるいは後天的にC3活性を抑制したマウスでは、プリオン病感染因子の腹腔内投与で伝播・発症が抑制されることが報告されている。我々は、特発性クロイツフェルト・ヤコブ病の症例から得られたDNAを試料として、C1q・C3受容体の遺伝子多型を解析して特発性症例の感染・発症におけるこれら受容体の関与を検討した。また、補体系活性を抑制する作用を有し、異常なプリオン蛋白の凝集を抑制することが報告されているclusterinについても同様に解析した。

特発性クロイツフェルト・ヤコブ病症例12例、対照としてプリオン蛋白遺伝子変異の解析のための試料から非プリオン病を選んで解析した。C3レセプターとしてCR1およびCR2を、C1qレセプターとしてC1q BPおよびC1q Rpの蛋白質コード領域をPCR法にて増幅した。clusterinについては、exon2/5/6/7を増幅した。PCR産物を鋳型にしてジデオキシ法でシークエンス反応を行い、ABI PRISM 310 (Applied Biosystems)にてDNA塩基配列を決定した。また、CR1のexon19/22/33における一塩基多型については、それぞれBstNI、RsaI、MnIIの制限酵素で切断し、15%アクリルアミドゲルで電気泳動して、断片長多型 (RFLP) を調べた。

(3) 異常型プリオン蛋白質特異的分子プローブの作製

PrP^{Sc}の解析が進んでいない理由として、実用可能なPrP^{Sc}特異的な分子プローブがないことが挙げられる。これまでに作製されたPrP分子に対する抗体(pan-PrP抗体)は、変性剤で処理したPrP^{Sc}および正常型プリオン蛋白質(PrP^C)に反応するが、未変性のPrP^{Sc}凝集体とは反応しない。その理由は、PrP^{Sc}凝集体は抗PrP抗体が認識するエピトープを露出していないからである。プリオンの感染性はPrP^{Sc}凝集体に付随しており、凝集体を解離・変性させると感染性は消失する。従って、現存する抗PrP抗体では感染性が付随するPrP^{Sc} (プリオン) の解析を行うことができない。そこで、感染性が付随する未変性PrP^{Sc}に対する分子プローブの作製を目的として、モノクローナル抗体(mAb)の作製を行った。

マウススクレイピー帯広株感染マウス脳から精製したPrP^{Sc}及び組換えマウスPrP(rMoPrP)をPrP遺伝子欠損マウスに免疫し、常法に従い細胞融合を行った。ハイブリドーマの培養上清は精製PrP^{Sc}およびrMoPrPを抗原としたELISAによりスクリーニングした。

〔結果と考察〕

(1) Dpl/PrPLPによる神経変性死の分子機構の解析

正常脳では生直後からPrPLP mRNA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。一方、*Ngsk Prnp^{0/0}*マウス脳ではPrPLP mRNA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た。in situ hybridizationと免疫組織化学法にて、正常マウスの脳におけるPrPLPの発現は血管内皮細胞に特異的に認められたが、*Ngsk Prnp^{0/0}*マウスでは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その発現が認められた。しかし、*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。これらの結果は、PrPLPの過剰発現がプルキンエ細胞死に参与していることを強く示唆した。また正常マウスにおけるPrPLPの脳血管内皮細胞での特異的発現様式は、PrPLPが脳血管または血液脳関門の形成に参与している可能性を示唆した。

NSE遺伝子のプロモーターの下流にPrPLP翻訳領域を挿入したNSE-PrPLP及びPCP2遺伝子のプロモーターの下流にPrPLP翻訳領域を挿入したPCP2-PrPLPをC57BL/6マウスの受精卵に注入した結果、3匹のTg(NSE-PrPLP)マウスおよび9匹のTg(PCP2-PrPLP)マウスを得た。それぞれのTgマウスは、1～数百コピーのPrPLP遺伝子が導入されていた。現在、*Zrch Prnp^{0/0}*マウスにPrPLP遺伝子を導入するために、これらのTgマウスと*Zrch Prnp^{0/0}*マウスとを交配中である。

(2) 特発性プリオン病の疾患感受性因子としての補体系分子の検索

解析した試料中には、CR1のexon19/22/33でそれぞれG3093T、A3650G、C5507Gの一塩基多型が存在した。3つの多型には強い連鎖があり、遺伝子型は、3093G/G・3650A/A・5507C/Cを持つものと、3093G/T・3650A/G・5507C/Gを持つものと2通りであった。検索した特発性クロイツフェルト・ヤコブ病5例中、前者が2例、後者が3例であった。また、CR1のexon26にACGからATGへのアミノ酸置換を伴う一塩基多型が見られ、このATGへの置換は検索した4例の特発性患者のうち3例の患者でヘテロに認められた。

C1q BPでは第3エクソン近傍のイントロン内に14bpの欠失多型が観察された。欠失は検索した9例の特発性患者では4例がヘテロで、残り5例がホモで持っていた。検索した4例の対照群でも同様の割り合い（2例がヘテロで、残り2例がホモ）で欠失多型が観察された。

今回の解析では、CR2、Clusterin、C1q Rpについては、検索した範囲内ではアミノ酸置換を伴う遺伝子多型は確認できなかったが、今後はさらに試料の数を増やして検討する必要がある。

(3) 異常型プリオン蛋白質特異的分子プローブの作製

エピトープ解析の結果から、樹立したmAbは少なくとも9群に分類可能であった。グループIからVIに分類したmAbは、PrP分子上の各々異なる連続エピトープを認識することが明らかとなった。グループVIIおよびVIIIに分類した抗体はaa155-231(VII)、およびaa89-121(VIII)の領域から構成される非連続エピトープを認識することが判明した。グループIからVIIIのmAbはELISAにおいてrMoPrPとは反応するが、PK処理した未変性PrP^{Sc}と反応しないかもしくは非常に弱い反応性を示すのみであった。しかし、3M GdnSCNで変性させたPrP^{Sc}とは反応することから、グループIからVIIIのmAbはpan-PrP抗体に属すると考えられる。

一方、グループIXに分類した抗体(mAb 6H10)はrMoPrPとは反応しないがPK処理未変性PrP^{Sc}と反応するという、pan-PrP抗体とは正反対の反応性を示した。mAb6H10がPrP^{Sc}と特異的に反応するがPrP^Cとは反応しない可能性が示唆された。mAb6H10の反応性を詳細に検討した。mAb6H10は未変性PrP^{Sc}を高濃度のPKで消化した場合でもPrP^{Sc}との反応性は消失しなかった。PK処理精製PrP^{Sc}画分をGdnHClで変性させた場合、3M以上の濃度のGdnHCl処理によりmAb6H10は反応しなくなるが、対照的にpan-PrP抗体はGdnHCl濃度の上昇に伴い反応性が顕著に上昇した。従ってmAb6H10がPrP^{Sc}上の構造エピトープを認識することが示唆された。mAb6H10はPrP^{Sc}とPrP^Cを識別可能であり、これまで樹立されてきたmAbとは明らかに異なる性質を示す。この抗体はプリオン本体の研究の大きなブレイクスルーになることが期待される。

〔結 論〕

- (1) Ngsk *Prnp*^{0/0}マウスにおけるプルキンエ細胞死には、遺伝子間スプライシングに基づくPrPLP/Dplの異所性発現が関与することが強く示唆された。また正常マウス脳では脳血管あるいは血液脳関門形成にPrPLP/Dplが機能する可能性が示唆された。さらに、神経細胞全般あるいはプルキンエ細胞特異的にPrPLP/Dplを過剰発現するTgマウスを作製した。
- (2) 特発性プリオン病の疾患感受性因子の候補として補体系蛋白のレセプターであるCR1、CR2、C1q BP、C1q Rpおよび補体抑制因子clusterinの遺伝子多型を、少数例の特発性ヤコブ病患者と対照群において解析した。これまでに検索した中では、CR1に複数のアミノ酸置換を伴う多型とC1q BPにイントロン部の多型が確認されたが、さらに症例数を増やし統計学的検討を加える必要がある。
- (3) PrP遺伝子欠損マウスにスクレイピー感染マウス脳から精製した感染性を有するPrP^{Sc}を免疫して、34のモノクローナル抗体(mAb)を樹立した。作製した抗体は認識するエピトープから9群に分類可能であった。そのうちmAb6H10は、PrP^{Sc}

凝集体上に存在するPrPSc特異的非連続エピトープを認識することが示唆された。

〔研究発表〕

1. 論文発表

- 1) Lehmann S, Laude H, Harris DA, Carp RI, Vilette D, Katamine S, Madec J-Y, and Nishida N. Ex vivo transmission of mouse-adapted prion strains to N2a and GT1-7 cell lines. In Alzheimer's Disease: Advances in Etiology, Pathogenesis and Therapeutics, 679-686, 2001
- 2) Atarashi, R., Sakaguchi, S., Shigematsu, K., Arima, K., Okimura, N., Yamaguchi, N., Li, A., Kopacek, J., Katamine, S.: Abnormal activation of glial cells in the brains of prion protein-deficient mice ectopically expressing prion protein-like protein, PrPLP/Dpl. *Mol. Med.* 7(12), 803-809, 2001
- 3) Horiuchi, M., Baron, G., Xiong, L.-W., and Caughey, B. Inhibition of interactions and interconversions of prion protein isoforms by peptide fragments from the C-terminal folded domain. *J. Biol. Chem.* 276: 15489-15497, 2001
- 4) Yamamoto, M., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Matsuo, T., and Kaneko, K. Glycidol degrades scrapie mouse prion protein. *J. Vet. Med. Sci.*, 63(9): 983-990, 2001
- 5) Kawashima T., Doh-ura K., Ogomori K., Iwaki T.: Apoptotic bodies in the cerebellum of Japanese patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Pathol. Int.* 51:140-144, 2001
- 6) Sasaki K, Doh-ura K, Ironside JW, Iwaki T: Increased clusterin (apolipoprotein J) expression in human and mouse brains infected with transmissible spongiform encephalopathies. *Acta Neuropathol.* 103: 199-208, 2002
- 7) 坂口末廣, 片峰茂: ノックアウトマウスとプリオン病 *CLINICAL NEUROSCIENCE* 19巻8号, 36-39, 2001
- 8) 品川森一、堀内基広、松井高峯: プリオンの免疫学的検出法. *生活衛生*45: 259-269, 2001
- 9) 池田徹也、堀内基広、古岡秀文、石黒直隆、品川森一: 牛海綿状脳症に関する検査概要と今後の対応. *食品衛生研究*52: 33-42 2002
- 10) 堀内基広: 動物のプリオン病. *ウイルス*51(2): 145-150, 2002

2. 学会発表

- 1) Horiuchi, M.: Detection of PrPSc for the diagnosis of prion diseases, 5th International Symposium on Infectious Disease, Chunju/Korea (2001)

- 2) Horiuchi, M.: Inhibition of pathogenic prion protein formation; implication for possible therapeutic target, Forum for Infectious Disease of the 21th Century, Osaka (2002)
- 3) 西田教行、有馬和彦、山口尚宏、新竜一郎、坂口末廣、片峰 茂：培養細胞を用いたマウスプリオン株のcell tropismの検討。日本ウイルス学会第49回学術集会、大阪、2001年11月
- 4) 新竜一郎、坂口末廣、山口尚宏、有馬和彦、西田教行、片峰 茂：変異プリオン蛋白トランスジェニックマウスを用いたプリオン蛋白正常機能の解析。日本ウイルス学会第49回学術集会、大阪、2001年11月
- 5) 有馬和彦、西田教行、山口尚宏、新竜一郎、坂口末廣、片峰 茂：プリオン蛋白の高次構造とプリオン株の生物学的性質。日本ウイルス学会第49回学術集会、大阪、2001年11月
- 6) 堀内基広：動物プリオン病診断法の現状と課題、Brain国際フォーラム 東京 (2001)
- 7) 山本真理、品川森一、石黒直隆、堀内基広：エポキシ化合物によるプリオン不活化、第131回日本獣医学会 東京 (2001)
- 8) 堀内基広、石黒直隆、品川森一：PrP合成ペプチドによるPrP分子間相互作用の阻害、第131回日本獣医学会 東京 (2001)
- 9) 毛利崇、堀内基広、石黒直隆、品川森一：免疫磁性ビーズを用いたPrP^{Sc}検出法の開発、第49回日本ウイルス学会 大阪 (2001)
- 10) 金チャンラン、毛利崇、狩野綾子、堀内基広、石黒直隆、品川森一：プリオン蛋白質に対するモノクローナル抗体パネルの作製、第49回日本ウイルス学会大阪 (2001)
- 11) 狩野綾子、堀内基広、石黒直隆、品川森一：精製PrP^{Sc}画分と特異的に反応するmAb6H10の解析、第49回日本ウイルス学会 大阪 (2001)
- 12) 堂浦克美：プリオン病の診断と治療—治療法開発の現状と早期診断法開発の重要性。第6回日本神経感染症研究会、札幌 (2001)
- 13) 堂浦克美：ヒトプリオン病の診断と治療—現状と将来への展望。第5回日本神経ウイルス研究会、大阪 (2001)

〔知的所有権の取得状況〕

1. 特許取得

堂浦克美、村上郁子「病原性プリオンタンパク質生成阻害用組成物および病原性プリオン蛋白質生成阻害方法」、特許願2001-227093、整理番号P0406T、2001年7月

2. 実用新案登録
なし

分 担 研 究 報 告

プリオン蛋白類似蛋白 (PrPLP) による神経細胞変性死の分子機構

班 員： 片峰 茂 (長崎大・院医・感染分子病態)
研究協力者： 坂口 末廣 (長崎大・院医・感染分子病態)
山口 尚宏 (長崎大・院医・感染分子病態)
重松 和人 (長崎大・医・病理)

〔研究要旨〕

今回、我々は、プリオン蛋白類似蛋白 (PrPLP) の過剰発現が、ある系統のPrP欠損 (*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かどうかを検討することにした。PrPLP mRNAの発現は、正常脳では生直後から認められるが、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。一方、*Ngsk Prnp^{0/0}*マウス脳ではPrPLP mRNA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た。また、*in situ hybridization*と免疫組織化学法にて、正常マウスの脳におけるPrPLPの発現は、血管内皮細胞に特異的に認められたが、*Ngsk Prnp^{0/0}*マウスでは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その発現が認められた。これらの結果は、PrPLPの過剰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。現在我々は、*Zrch Prnp^{0/0}*マウスにPrPLPを過剰発現するようにPrPLP遺伝子を導入し、小脳プルキンエ細胞変性死が起こるかどうか検討しているところである。

〔研究目的〕

はじめに報告された2系統のプリオン蛋白 (PrP) 遺伝子欠損 (*Zrch Prnp^{0/0}*及び *Edbg Prnp^{0/0}*) マウスには、何ら異常は認められなかった^{1, 2)}。しかし奇妙なことに、我々が独自に作製した*Prnp^{0/0}* (*Ngsk Prnp^{0/0}*) マウスは、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³⁾。どのような分子機構でこのような表現型の違いが生じたのか不明である。プルキンエ細胞死を呈しないマウスに用いられたターゲティングベクターでは、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が正常に保存されているが、細胞死を呈した系統のマウスのベクターでは、その部位が欠損している。このことは、細胞死を呈した系統のマウスのPrP遺伝子座で何らかのスプライシング異常が起き、PrP以外の遺伝子に異常を来し、それによってプルキンエ細胞の変性脱落が生じた可能性を示唆した。以前我々は、PrP遺伝子の下流に、PrPと非常に類似した蛋白 (PrP-like protein, PrPLP)

をコードする遺伝子を同定したことを報告した⁴⁾。そして、細胞死を呈する *Ngsk Prnp^{0/0}* マウスの脳内では、残存 PrP 遺伝子エクソン 1 と 2 および PrPLP 遺伝子の蛋白翻訳領域を含むエクソンから成るキメラ mRNA が過剰に産生されていた⁴⁾。一方、細胞死を呈しない *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⁴⁾。

今回、我々は、PrPLP の過剰発現が *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かどうかを検討することにした。まず、正常マウスと *Ngsk Prnp^{0/0}* マウスの脳での PrPLP 発現様式および発現細胞の比較検討を行った。次に、*Zrch Prnp^{0/0}* マウスに PrPLP を過剰発現するように PrPLP 遺伝子を導入し、小脳プルキンエ細胞変性死が起こるかどうか検討することにした。

〔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) ノーザンブロッティング法

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 mg / 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) In situ hybridization 法

感染脳組織を 4% パラフォ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°C 10 分処理し、ハイブリダイゼーション (50% フォルマミド、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°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 mg/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結合抗ジゴ

キシゲニン抗体で検出した。

4) トランスジェニック (Tg) マウスの作成

ハムスターPrPをneuron-specific enolase (NSE) プロモーターの下流に挿入したNSE-HPrPプラスミド (Chesebro博士より分与) からハムスターPrP遺伝子を除き、Hind IIIサイトにPrPLP遺伝子の翻訳領域を挿入したNSE-PrPLPプラスミド作製した。また、プルキンエ細胞特異的に発現するPurkinje cell protein (PCP)-2遺伝子のプロモーターを有するPCP2SプラスミドのSal Iサイトに、PrPLP遺伝子の翻訳領域を挿入したPCP2-PrPLPプラスミド作製した。それぞれのプラスミドからNSE-PrPLPとPCP2-PrPLPを精製し、C57BL/6マウスの受精卵に注入し、Tgマウスを作製した。

〔結果と考察〕

PrPLPの過剰発現とプルキンエ細胞死との関係を検討するため、まず我々は、正常マウスと*Ngsk Prnp*^{0/0}マウスの脳におけるPrPLPの発現様式の違いをノーザンブロットングにて明らかにした。図1aに示すように、正常脳では生直後からPrPLP mRNA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。一方、*Ngsk Prnp*^{0/0}マウス脳ではPrPLP mRNA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た (図1b)。また、in situ hybridizationと免疫組織化学法にて、正常マウスの脳におけるPrPLPの発現は血管内皮細胞に特異的に認められたが、*Ngsk Prnp*^{0/0}マウスでは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その発現が認められた (data not shown)。

PrPLPの脳血管内皮細胞での特異的発現様式は、PrPLPが脳血管または血液脳関門の形成に関与している可能性を示唆した。しかし、正常マウスにおけるPrPLPの機能はまだ明らかでなく、さらなる研究が必要である。

Ngsk Prnp^{0/0}マウスでは、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で止まらず下流の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る。そして、この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、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。しかし、*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⁴⁾。これらの結果は、PrPLPの過剰発現がプルキンエ細胞死に関与していることを強く示唆した。次に、我々は、PrPLPの過剰発現が*Ngsk Prnp*^{0/0}マウスの小脳プルキンエ細胞変性

死に関与しているかどうか最終結論を出すために、プルキンエ細胞死を呈しない *Zrch Prnp^{0/0}*マウスにPrPLPを過剰に発現させ、プルキンエ細胞死が起きるかどうかを検討することにした。まず我々は、PrPLPを神経細胞またはプルキンエ細胞特異的に発現するTgマウスを作製することにした。PrPLPを神経細胞特異的に発現するように、NSE遺伝子のプロモーターの下流にPrPLP翻訳領域を挿入したNSE-PrPLPを構築した(図2)。また、プルキンエ細胞特異的に発現するように、PCP2遺伝子のプロモーターの下流にPrPLP翻訳領域を挿入したPCP2-PrPLPを構築した(図2)。これらをC57BL/6マウスの受精卵に注入した結果、3匹のTg(NSE-PrPLP)マウスおよび9匹のTg(PCP2-PrPLP)マウスを得た(表1)。それぞれのTgマウスは、1~数百コピーのPrPLP遺伝子が導入されていた。現在、*Zrch Prnp^{0/0}*マウスにPrPLP遺伝子を導入するために、これらのTgマウスと*Zrch Prnp^{0/0}*マウスとを交配中である。

[参考文献]

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) Li, A., Sakaguchi, S., Atarashi, R., Roy, B. C., Nakaoke 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.* 20: 553-567, 2000

[研究発表]

1. 論文発表

- 1) Atarashi R., Sakaguchi S., Shigematsu K., Arima K., Okimura N., Yamaguchi N., Li A., Kopacek J., Katamine S.: Abnormal activation of glial cells in the brains of prion protein-deficient mice ectopically expressing prion protein-like protein, PrPLP/Dpl. *Mol. Med.* 7: 803-809, 2001

2. 学会発表

- 1) 西田教行、有馬和彦、山口尚宏、新竜一郎、坂口末廣、片峰 茂: 培養細胞を用いたマウスプリオン株のcell tropismの検討. 日本ウイルス学会第49回学術集会、大阪、2001年11月
- 2) 新竜一郎、坂口末廣、山口尚宏、有馬和彦、西田教行、片峰 茂: 変異プリオン蛋白トランスジェニックマウスを用いたプリオン蛋白正常機能の解析. 日本ウイルス学会第49回学術集会、大阪、2001年11月
- 3) 有馬和彦、西田教行、山口尚宏、新竜一郎、坂口末廣、片峰 茂: プリオン蛋白の高次構造とプリオン株の生物学的性質. 日本ウイルス学会第49回学術集会、大阪、2001年11月

[知的財産権の出願・登録状況]

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |

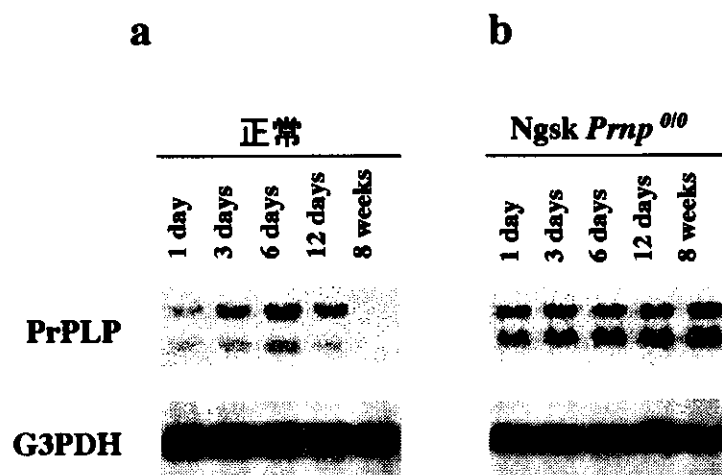


図1：正常および *Ngsk Prnp^{0/0}* マウス脳におけるPrPLP発現の経時的変化

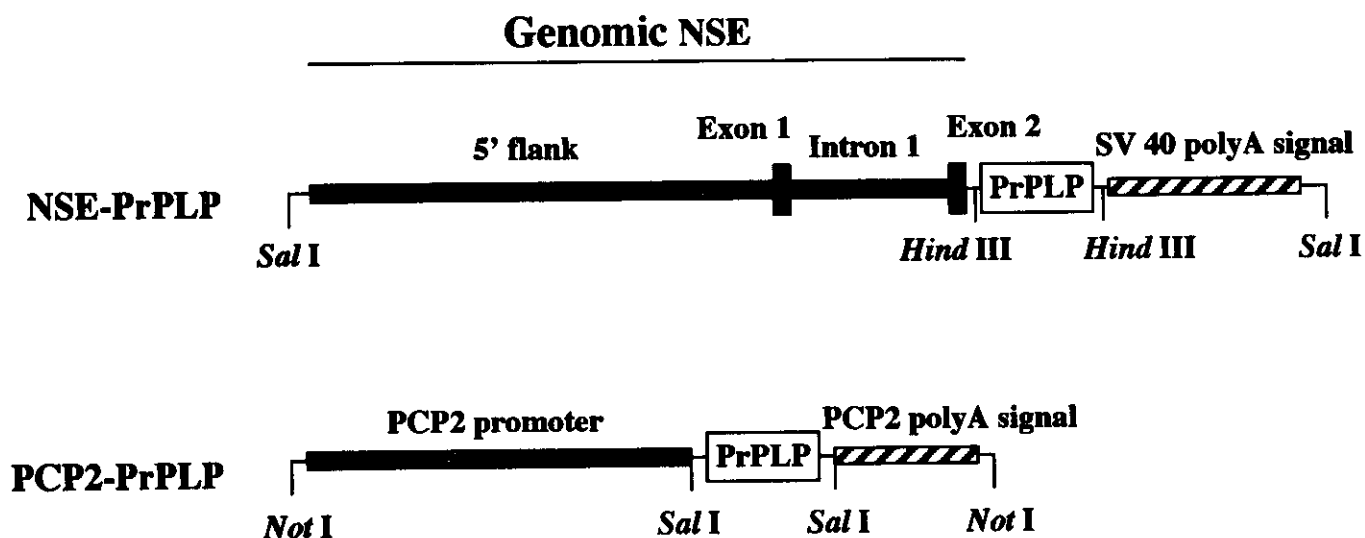


図2：Tgマウス作成に用いたベクターの構造