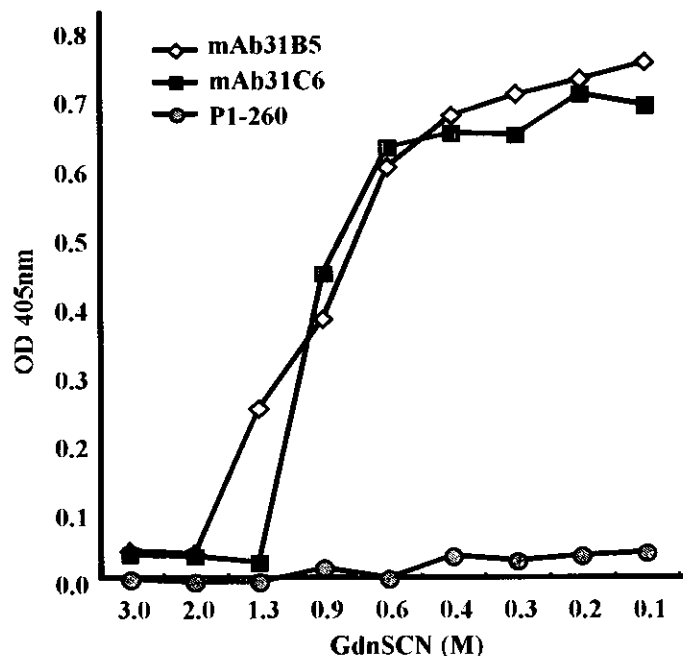


- 1) Yamamoto M, Horiuchi M, Ishiguro N, Shinagawa M, Matsuo T, Kaneko K.: Glycidol degrades scrapie mouse prion protein. *J. Vet. Med. Sci.* 63:983-690, 2001
- 2) 品川 森一、堀内 基広：牛海綿状脳症について. 北海道公衆衛生学雑誌. 14:12-20, 2001
- 3) 品川 森一、堀内 基広、松井 高峯：プリオンの免疫学的検出法. 生活衛生. 45:259-269, 2001
- 4) 池田 徹也、堀内 基広、古岡 秀文、石黒 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

## 2.学会発表

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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<sup>Sc</sup> 検出法の開発、第 49 回日本ウイルス学会 大阪(2001)
- 4) 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)
- 5) 狩野 綾子、堀内 基広、石黒 直隆、品川 森一：精製 PrP<sup>Sc</sup> 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)
- 6) ゴンボジャブ、アルタンゲレル、堀内 基広、石黒 直隆、品川 森一、毛利 資郎、高田 益宏：羊 PrP 遺伝子 Tg マウスの羊スクレイピープリオンに対する感受性、第 49 回日本ウイルス学会 大阪(2001)



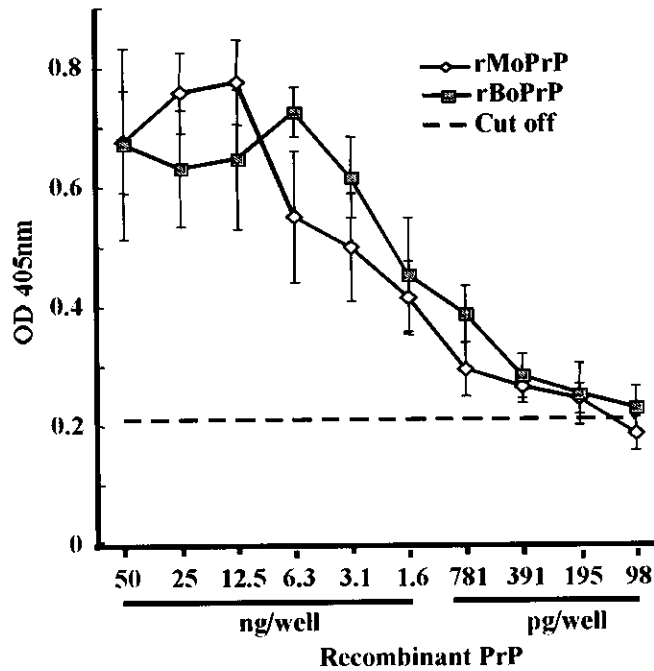
**Fig.1 Suitable GdnSCN concentration for Captured ELISA.** ELISA plate was coated with mAb31B5, mAb31C6 or negative mAb (Anti parvovirus P1-260-1-4) as captured antibodies. rMoPrP(1 µg/ml) dissolved with PBS containing various concentration of GdnSCN (indicated at the bottom) was added to the well. For detection of rMoPrP, biotinylated B-103 Fab' fragment was used.

**Detector antibodies (Biotinylated Fab')**

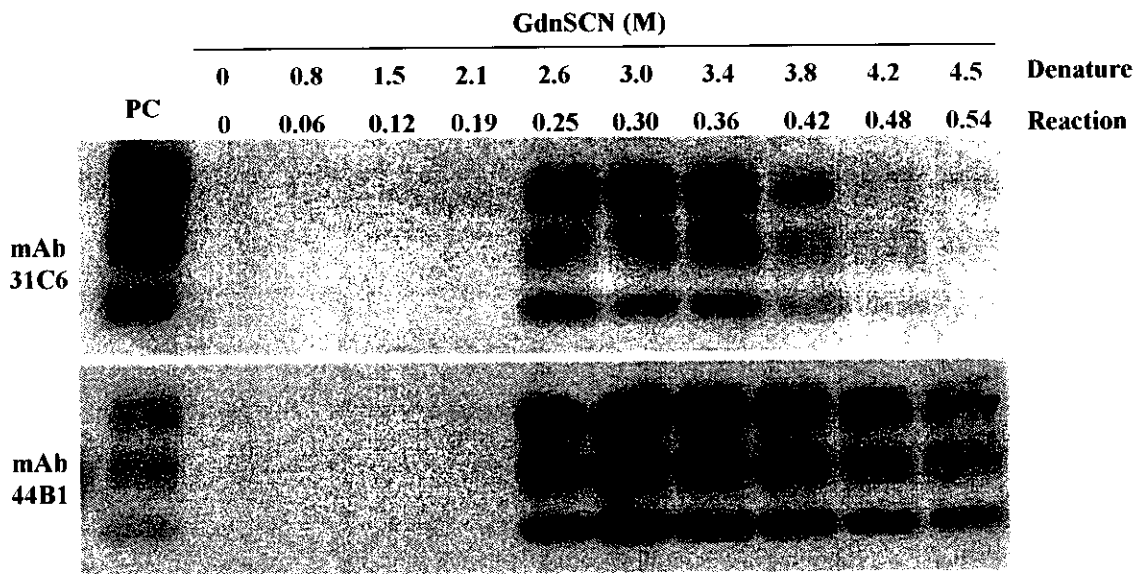
	39-2	72-5	110-2	43C5	44B1	44B2	31C6	B-103
39-2		±	±	±	±	±	±	-
72-5	+		NS	±	NS	-	-	+++
110-2	-	+++		-	+	+	+	NS
43C5	±	-	+		+	-	+++	±
44B1	±	+++	NS	-		+++	+++	+++
44B2	±	-	-	-	+++		-	+
31C6	+	±	+++	±	+++	+		+
B-103	±	+	NS	-	+++	+	+	

Capture antibodies

**Fig.2 Determination of suitable pair of antibodies.** The suitable pair of antibodies for capture and for detector was determined based on high sensitivity and low non-specific reaction. Sensitivity of the captured ELISA using each pair was evaluated as follows: ++,high; +,Moderate; ±,low; -,Negative. NS indicates that the pair gave non-specific reaction.



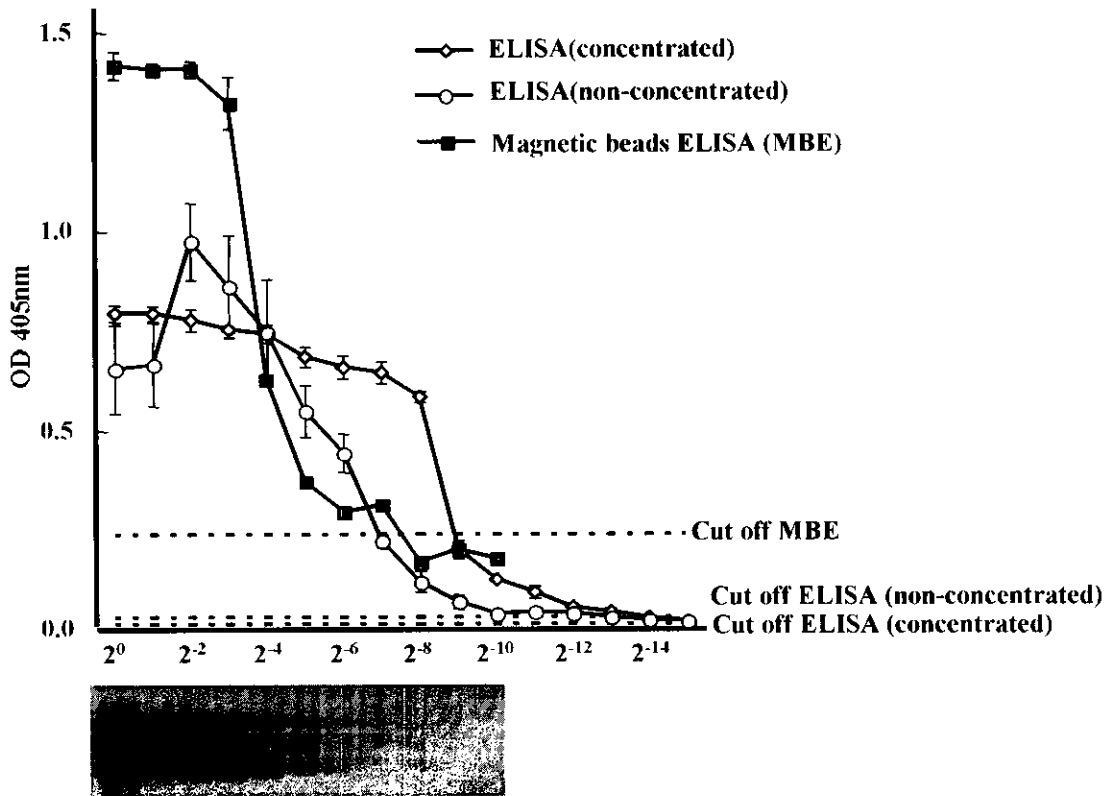
**Fig.3 Detection limit of Captured ELISA.** rMoPrP and rBoPrP were diluted with PK treated normal mice brain homogenates in PBS containing 0.4 M GdnSCN. MAbs 44B1 and 72-5 was used for capture and detector respectively. Cut off value was determined from an average of negative control (n=8) plus 3 standard deviation.



**Fig.4 Determination of GdnSCN concentration for immunoprecipitation with magnetic beads.** Scrapie-affected mice brain homogenates were denatured with various concentration of GdnSCN and diluted with constant volume of PBS for immunoprecipitation. GdnSCN concentrations in denaturation step and immuno-reaction are indicated on the top. Immunoprecipitated PrP<sup>Sc</sup> with mAbs indicated on the left was detected in Western blot using biotinylated B-103 as primary antibodies. PC indicates positive control (0.4mg brain equivalent of scrapie-affected mouse)

Table 1. Immuno-magnetic beads ELISA

mAb		Mouse brain	OD (405nm)
Capture	Detector		
mAb44B1	mAb31C6	Infected	0.758
mAb44B1	mAb31C6	Uninfected	0.182
Anti-KLH mAb	mAb31C6	Infected	0.191



**Fig.5 Comparison of sensitivity of PrP<sup>Sc</sup> detection.** Sensitivities of Western blot, captured ELISA (using concentrated and non-concentrated preparations) and immuno-magnetic beads-ELISA were compared by endpoint titration. Before PK treatment, scrapie affected-mouse brain homogenates were serially diluted with normal mouse brain homogenates with 2-folds dilution to mimic the brain sample containing low prion infectivity. Cut off value was determined from an average of OD value of normal mouse samples (n=6) plus 3 standard deviations.

# 正常型プリオンタンパク質分解活性の検索と、 プリオン病の病態解明に向けた基礎研究

班 員：金子 清俊（国立精神・神経センター 神経研究所・疾病研究第七部）  
研究協力者：桜井 総子、鎌田 礼子、古田 大、八谷 如美（同・疾病研究第七部）

## 【研究要旨】

正常型プリオン（PrP<sup>C</sup>）が、異常感染型プリオン（PrP<sup>Sc</sup>）に構造変換する機構を解明することは、プリオン病治療に向けた重要な知見である。とりわけ、従来よりいったん分解された PrP<sup>C</sup> は PrP<sup>Sc</sup> への変換を免れることが知られていることから、我々はこの PrP<sup>C</sup> 分解活性に関わる因子の同定を試みてきた。

組換えプリオンタンパク質（rec PrP）を基質とした *in vitro* 分解アッセイ系を用い、様々な条件下で rec PrP 分解活性を検索した結果、マウス大脳皮質より分画した lipid rafts 画分から、複数の分解活性が検出された。さらに、これらの分解活性のうちには、*in vivo* における PrP<sup>C</sup> 分解活性と同質と考えられる活性が含まれていた。現在我々は、この活性を担う候補蛋白質の同定とその機能を検討中である。

The proteolysis of a cellular prion protein in its metabolic pathway

Kiyotoshi KANEKO,

Michiko ISHIKAWA-SAKURAI, Reiko KAMATA, Masaru FURUTA and Naomi S. HACHIYA\*

Department of Cortical Function Disorders, National Institute of Neuroscience,

National Center of Neurology and Psychiatry, Kodaira, Tokyo 187-8502 Japan. \*CREST・JST

## ABSTRACT

We have found a proteolytic activity in detergent-extract of lipid rafts. The activity produced an 11-kDa amino-terminus fragment from recombinant prion protein (rec PrP) as substrate by using *in vitro* PrP cleavage assay. This proteolytic product was indistinguishable from that of PrP<sup>C</sup> utilized during its metabolic pathway *in vivo*, which was also governed in lipid rafts. The candidate, which was responsible for the activity has been under consideration. The metabolism of PrP gives us a clue to investigate a conversion mechanism of PrP<sup>C</sup> into PrP<sup>Sc</sup>.

## 【はじめに】

正常型プリオン（PrP<sup>C</sup>）は、異常感染型プリオン（PrP<sup>Sc</sup>）を鋳型としてタンパク質の高次構造変換を起こすことで PrP<sup>Sc</sup> に変換すると考えられている。従来、PrP<sup>C</sup> から PrP<sup>Sc</sup> への構造変換は細胞表面の微少膜ドメインである lipid rafts に限局して起こり（1）、また lipid rafts において未知のタンパク質分解酵素により分解を受けた PrP<sup>C</sup> は、PrP<sup>Sc</sup> への変換を免れる（2）ことが示唆されてきた。このタンパク質分解は、プリオンタンパク質の代謝過程における最初の分解であると考えられる。これらの点から、我々は PrP<sup>C</sup> の代謝に関与するタンパク質分解酵素、およびその作用機序を見出すことを目的とした研究を進めている。これを手がかりとして PrP<sup>C</sup> から PrP<sup>Sc</sup> への変換機構の解明並びにプリオン病治療・予防法開発へと展開する。

我々は、組換えプリオンタンパク質（rec PrP）を基質とした *in vitro* PrP 分解アッセイ系を確立した。この系を用いて PrP 分解活性を検索した結果、マウス大脳皮質より得られた lipid rafts 画分に、複数の PrP 分

解活性の存在を認めた。これらの分解活性の一つは、*in vivo* で検出される PrP<sup>C</sup> の中間代謝産物と同質の分解産物を生じることから、現在その詳細を検討している。

### 【目的】

PrP<sup>C</sup> の代謝機構並びに PrP<sup>Sc</sup> への変換機構を解明するため、生体内で PrP と相互作用する分子群を特定し、その作用機序を見出すことを目的とする。

### 【材料と方法】

組換えプリオンタンパク質(rec PrP)を基質とし *in vitro* の至適条件下でマウス大脳皮質より得られた lipid rafts 画分と反応させた後、抗 PrP 抗体 (3F4、M-20) を用いたイムノプロットで分解産物を可視化する *in vitro* PrP 分解アッセイ系を構築し、lipid rafts 画分に含まれる PrP 分解活性を検索した (3)。マウス (FVB 系、6-8 週令、オス) の大脳皮質を、1% Triton X-100 にて溶解後シヨ糖密度勾配遠心により分画し lipid rafts 画分を得た。lipid rafts 画分は界面活性剤処理にて抽出画分を得た後、陰イオン交換カラムアフィニティークロマトグラフィーにより分画、標的タンパク質を濃縮した。得られたサンプルは等電点電気泳動、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて二次元に展開した。スポットに分離したタンパク質はゲル中で透析により変性剤を除いて再賦活化し、PrP 分解活性の検討に用いた。

(倫理面への配慮) マウスから脳を採取する際には、苦痛を与えないように最大限の配慮を行った。

### 【結果】

*In vitro* PrP 分解アッセイ系を用いて、マウス大脳皮質より分画した lipid rafts 画分に認められる PrP 分解活性を検討したところ、抗 PrP 抗体 (3F4) に反応性を示す分子量 11-kDa の分解産物を産出する分解活性を認めた (図 1a、lane 2)。この分解産物は、培養細胞で検出される PrP 断片 (lane 3) と同様の抗体反応性および分子量を呈した。分解産物の抗 PrP 抗体 (3F4、M-20) 反応性およびその分子量から、切断部位は基質分子の中央部分であると推定した (図 1b)。

この PrP 分解活性を担うタンパク質分解酵素の分離、精製を試みた。lipid rafts 画分の界面活性剤抽出画分を陰イオン交換カラムアフィニティークロマトグラフィーを用いて分画後、PrP 分解活性を含む画分を得た。この画分に含まれるタンパク質を二次元電気泳動により展開した後、出現した各スポットについて PrP 分解活性を検討したところ、単一のスポットにのみ活性が認められた (図 2a、lane 2)。

### 【考察】

PrP の生理的機能およびプリオン病の発症・病態を理解する上で、PrP のタンパク質代謝の全容を明らかにすることは重要である。我々はまず、PrP 代謝に関わる最も基本的な分子の一つとしての PrP 分解酵素に着目し、これを同定することを試みている。従来 PrP<sup>C</sup> は、成熟したタンパク質として細胞膜表面に分泌された後、タンパク質分解を受けると、その分解産物は PrP<sup>Sc</sup> へ変換するための基質となることを免れることが示唆されている (2)。このことから PrP 分解を亢進することにより、プリオン病の発症を抑制できる可能性がある。以上の点から PrP 分解酵素の研究はプリオン病の治療・予防法開発に向けた基礎的研究として期待されるものである。

昨年度は分解活性を生体外で検出するための *in vitro* PrP 分解アッセイ系を確立し、それを用いてマウス大脳皮質由来の lipid rafts 画分中に、複数の PrP 分解活性を検出したことを報告した (3)。今年度我々は、その中の一つにつき詳細を検討している。その PrP 分解活性は、切断部位が PrP 分子内の 3F4 エピトープ (アミノ酸番号 109-112) の C 末端側 20~30 アミノ酸残基の領域内にあると推定でき、これは培養細胞を用いて検討した PrP<sup>C</sup> の代謝過程において認められる PrP の代謝中間産物 (4) と相同の分解活性である。すなわち今回我々が見出した PrP 分解活性は、生体内で実際に PrP<sup>C</sup> を分解し、その代謝に関わる分子である

析を行った。粗分画した lipid rafts 抽出画分を二次元電気泳動により個々のタンパク質に分離、スポット化した。これらのタンパク質を再賦活化した後、各スポットに含まれるタンパク質の PrP 分解活性を検討した。現在までに PrP 分解酵素の候補タンパク質を確認している。このタンパク質の分解活性、発現様式、および機能の詳細について解析を進めている。

#### 【結論】

*In vitro* PrP 分解アッセイ系を用いて、PrP<sup>C</sup>の代謝による分解に関わると考えられる PrP 分解活性の存在を確認した。この活性を担う候補タンパク質について、詳細を検討している。

#### 【参考文献】

- 1) Kaneko K., Vey M., Scott M., Pilkuhn S., Cohen F. E., and S. B. Prusiner: COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 2333-2338, 1997
- 2) Borchelt D. R., Taraboulos A., and S. B. Prusiner: Evidence for synthesis of scrapie prions in the endocytic pathway. J. Biol. Chem. 267: 16188-16199
- 3) 金子清俊、桜井総子、高井恵理子、鎌田礼子、吉田幹晴: 正常プリオンタンパク質 (PrP<sup>C</sup>) を分解するプロテアーゼの検索と、プリオン病の病態解明に向けた基礎研究. 厚生省特定疾患遅発性ウイルス感染調査研究班平成 12 年度研究報告書. 110-113, 2001
- 4) Harris D. A., Huber M. T., van Dijken P., Shyng S.-L., Chait, B.T. and R. Wang: Processing of a cellular prion protein. Identification of N- and C-terminal cleavage sites. Biochemistry. 32: 1009-1016, 1993

#### 【研究発表】

##### 1. 論文発表

- 1) Laws DD, Bitter HM, Liu K, Ball HL, Kaneko K, Wille H, Cohen FE, Prusiner SB, Pines A, Wemmer DE: Solid-state NMR studies of the secondary structure of a mutant prion protein fragment of 55 residues that induces neurodegeneration. Proc Natl Acad Sci USA. 98: 11686-11690, 2001
- 2) Peretz D, Williamson RA, Kaneko K, Vergara J, Leclerc E, Schmitt-Ulms G, Mehlhorn IR, Legname G, Wormald MR, Rudd PM, Dwek RA, Burton DR, Prusiner SB: Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. Nature. 412: 739-743, 2001
- 3) Zulianello L, Kaneko K, Scott M, Erpel S, Han D, Cohen FE, Prusiner SB: Dominant-negative inhibition of prion formation diminished by deletion mutagenesis of the prion protein. J Virol. 74: 4351-4360, 2000
- 4) 岸田日帯、戸田宏幸、金子清俊: 遺伝子改変動物から見たプリオン病研究の進歩. 脳と神経. 53: 821-827, 2001
- 5) 戸田宏幸、金子清俊: 認知機能障害を呈する疾患 プリオン病. medicina. 38: 1370-1371, 2001
- 6) 桜井総子、伊藤卓、金子清俊: プリオン病—プリオンの代謝経路の解明と治療への応用.細胞工学. 20:1485-1488, 2001
- 7) 岸田日帯、戸田宏幸、金子清俊: 神経変性疾患の最前線—分子病態と治療に向けて— 4. プリオン病 分子と治療に向けて. Molecular Medicine. 38: 1254-1260, 2001

##### 2. 学会発表

なし

#### 【知的所有権の取得状況】

なし

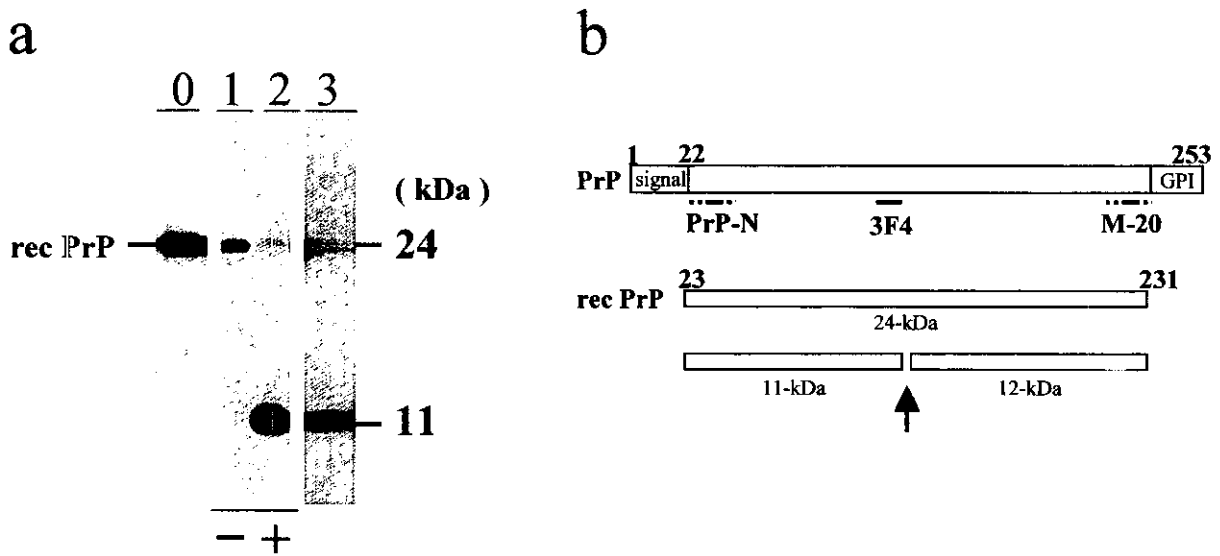


図1 : a. *in vitro* 分解アッセイ系を用いたプリオンタンパク質分解活性の検討。  
 抗プリオンタンパク質抗体 (3F4) を用いたイムノプロットで11-kDaの分解産物を検出した。 b. 推定上の切断部位を模式的に示した。

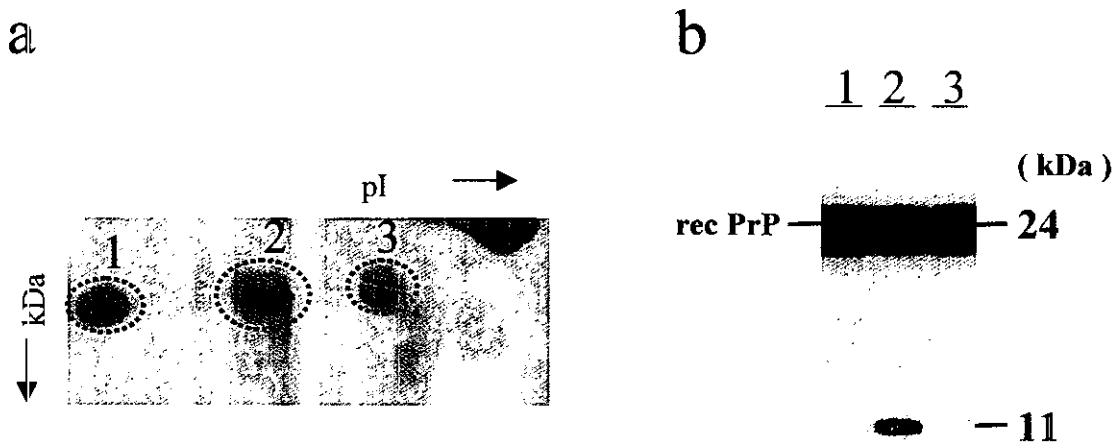


図2 : a. 粗分画したlipid rafts画分を二次元電気泳動により展開、タンパク質染色した (一部分)。  
 各スポットに含まれるタンパク質について、プリオンタンパク質分解活性を検討した。



## プリオン蛋白 (PrP) 機能領域の解析

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)  
西田 教行 (長崎大学・大学院医・感染分子病態)  
重松 和人 (長崎大学・医学部・病理)

### 【研究要旨】

我々が作製したプリオン蛋白欠損 (*Ngsk Prnp*<sup>0/0</sup>) マウスに認められたプルキンエ細胞変性死は、マウスプリオン蛋白 (PrP) 遺伝子を再導入することによって正常に回復した。そこで、我々は、プルキンエ細胞生存維持に必要な PrP の機能領域を解析するために、ハムスター PrP、マウスとハムスターのキメラ PrP、N 末領域 (アミノ酸 23-88) を欠損する PrP(del23-88)、及びヒト遺伝性プリオン病に関連した変異を有する PrP(E199K) を *Ngsk Prnp*<sup>0/0</sup> マウスに導入し、プルキンエ細胞死が起こるかどうかが検討した。その結果、PrP(del23-88) を発現する *Ngsk Prnp*<sup>0/0</sup> マウスでは著明なプルキンエ細胞死が認められたが、その他の PrP を発現する *Ngsk Prnp*<sup>0/0</sup> マウスのプルキンエ細胞は正常であった。つまり、銅イオン結合領域とされる octapeptide repeats を含む N 末領域 (アミノ酸 23-88) がプルキンエ細胞生存に必要であることが明らかとなった。また、遺伝性プリオン病関連変異 PrP は、正常機能を保持していることが示唆された。

Elucidation of the essential domain of prion protein to the long-term survival of Purkinje cells

Sigeru KATAMINE<sup>1)</sup>, Suehiro SAKAGUCHI<sup>1)</sup>,  
Ryuichiro ATARASHI<sup>2)</sup>, Noriyuki NISHIDA<sup>1)</sup>, Kazuto SHIGEMATSU<sup>3)</sup>

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

### ABSTRACT

We previously demonstrated that PrP-deficient (*Ngsk Prnp*<sup>0/0</sup>) mice developed at an old age Purkinje cell degeneration, which could be rescued by introduction of the mouse PrP gene. In the present study, to elucidate the essential domain of PrP to the Purkinje cell survival, we generated five different transgenic (Tg) mouse lines expressing PrP mutants on the *Ngsk Prnp*<sup>0/0</sup> background. Three lines of Tg mice, each designated Tg(H), Tg(MH2M), and Tg(MHM2) *Ngsk Prnp*<sup>0/0</sup> mice, expressed the hamster PrP and two kinds of the mouse-hamster chimeric PrPs, respectively. The Tg(MHM2 del23-88) *Ngsk Prnp*<sup>0/0</sup> mice expressed the mouse-hamster chimeric PrP lacking N-terminal half (aa 23-88), and the Tg(E199K) *Ngsk Prnp*<sup>0/0</sup> mice harbored the gene with a inherited prion disease-related mutation, E199K. The Tg(MHM2 del23-88) *Ngsk Prnp*<sup>0/0</sup> mice exhibited Purkinje cell degeneration similar to the *Ngsk Prnp*<sup>0/0</sup> mice, whereas the other Tg lines developed normally without the degeneration. These results clearly indicated that the domain in the N-terminal half of PrP is essential to the long-term survival of Purkinje cells in the mice.

### 【はじめに】

我々は、当教室で作製したプリオン蛋白欠損 (*Ngsk Prnp*<sup>0/0</sup>) マウスが、生後 1 年程すると小脳プ

ルキンエ細胞の変性死を生じ、失調性歩行を呈することを報告した<sup>1)</sup>。さらに我々は、マウスプリオン蛋白 (PrP) 遺伝子を *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* マウスに再導入すると、プルキンエ細胞が正常に回復することを報告した<sup>2)</sup>。これらの結果は、PrP がプルキンエ細胞の長期生存維持に必要なことを明らかに示した。今回、我々は、プルキンエ細胞生存維持に必要な PrP の機能領域を解析するために、変異や欠損を有する様々な PrP 遺伝子を *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* マウスに導入し、プルキンエ細胞死が起こるかどうか検討した。

## [材料と方法]

### 1) トランスジェニック(Tg)マウス

ハムスターPrPを発現する Tg(H)マウス<sup>3)</sup>、マウスとハムスターのキメラ PrP を発現する Tg(MHM2) と Tg(MH2M)マウス<sup>4)</sup>、N 末領域 (アミノ酸 23-88) を欠損する PrP を発現する Tg(MHM2 del23-88) マウス<sup>5)</sup>、及びヒト遺伝性プリオン病に関連した変異 PrP を発現する Tg(E199K)マウス<sup>6)</sup>は、プルシナー博士 (米国) から分与して頂いた。すべてのトランスジーンは、プロモーター領域を含む全 PrP 遺伝子が挿入されたコスミドベクターを用いて作製されている。これらの Tg マウスと *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* マウスを交配し、*Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* マウスのバックグランドにそれぞれの PrP トランスジーンを発現する Tg(H) *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>*、Tg(MH2M) *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>*、Tg(MHM2) *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>*、Tg(MHM2 del23-88) *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>*、および Tg(E199K) *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* マウスを作製した。

### 2) 免疫組織化学

マウス脳組織切片を常法に従い脱パラし、1mg/ml トリプシンにて 37°C、15 分間反応させた後、3% 過酸化水素で 30 分間処理した。次に、抗 spot35 抗体 (1:50、Dako) を 4°C、一晚反応させ、EnVision+ キット (Dako) と 0.04% diaminobenzine (Sigma)にてシグナルを検出した。

### 3) superoxide dismutase (SOD)、および glutathione peroxidase (GPX)活性測定

総 SOD 活性は、6 ヶ月齢のマウスの脳乳剤に、xanthine, xanthine oxidase,及び nitroblue tetrazolium (NBT)を加え、NBT の還元抑制を 560nm の蛍光強度を測定することにより行った。次に、Cu/Zn-SOD 活性を抑制するために 2mM KCN を加えて、同様に Mn-SOD 活性を測定した。Cu/Zn-SOD 活性は、総 SOD 活性から Mn-SOD 活性を差し引いた。

GPX 活性は、脳乳剤に NADPH, glutathione reductase,および還元型 glutathione を加え、NADP の産生を 340nm の蛍光強度を測定することにより行った。

### (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]

我々は、プルキンエ細胞の生存維持に必要な PrP の機能領域を解析するために、*Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* マウスのバックグランドにさまざまな PrP トランスジーンを発現する Tg(H) *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>*、Tg(MH2M) *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>*、Tg(MHM2) *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>*、Tg(MHM2 del23-88) *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>*、および Tg(E199K) *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* マウスを作製した (図 1)。これらのマウスを約 2 年間行動観察した結果、Tg(H) *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>*、Tg(MH2M) *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>*、Tg(MHM2) *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>*、および Tg(E199K) *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* マウスは、失調性歩行を呈さなかったが、Tg(MHM2 del23-88) *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* マウスは *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* マウスと同様な時間経過で失調性歩行を呈した(data not shown)。また、20 ヶ月齢のそれぞれのマウスの脳を、プルキンエ細胞を特異的に認識する spot35 抗体を用いた免疫組織化学に供した結果、Tg(MHM2 del23-88) *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* マウス脳では *Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>* マウスと同様にプルキンエ細胞の著明な変性脱落が認められたが、その他のマウス脳では認められなかった (図 2)。これらの結果は、ハムスターPrP はマウス PrP と機能的に互換性があること、及び PrP の N 末領域 (アミノ酸 23-88) がプルキンエ細胞の長期生存に必要なことを示

した。

PrP の N 末領域は、*Ngsk Prnp*<sup>0/0</sup> マウスのプルキンエ細胞変性死にどのように関与しているのだろうか。この領域には、銅イオンと結合すると考えられている octapeptide repeats (アミノ酸 51-90) が存在する。最近、PrP は、銅イオンを細胞内に輸送し、銅イオン依存性還元酵素である Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD) などの活性調節を行っているという考えが提唱されている<sup>7)</sup>。そこで、我々は、*Ngsk Prnp*<sup>0/0</sup> マウス脳における Cu/Zn-SOD の活性を測定した。図 3 に示すように、*Ngsk Prnp*<sup>0/0</sup> マウスにおける Cu/Zn-SOD 活性は、正常マウスやマウス PrP を再導入した Tg(M) *Ngsk Prnp*<sup>0/0</sup> マウスと同様に高かった。このことは、*Ngsk Prnp*<sup>0/0</sup> マウスの神経細胞内における銅イオンの量は正常であることを示唆しており、プルキンエ細胞死における銅イオンの関与は否定的であると考えられた。また、*Ngsk Prnp*<sup>0/0</sup> マウス脳内における Mn-SOD や glutathione peroxidase (GPX) の活性も正常であり (図 3)、酸化ストレスの関与も否定的であることが示唆された。一方、Weissmann らは、PrP がリガンド (未同定) と結合し、神経細胞の生存に必要なシグナルを産生するという興味深い仮説を提唱している<sup>8)</sup>。この仮説によると、N 末領域は PrP リガンドに結合するのに大切であり、N 末領域を欠損する PrP はリガンドと結合できず、神経細胞死が起こる。この仮説は大変魅力的であるが、その是非に関しては、PrP リガンドの同定を待つ必要がある。

ヒト遺伝性プリオン病は優勢遺伝病であり、PrP 遺伝子に様々な変異が認められる。これらの変異 PrP の機能が正常であるのかどうか解明されていない。また、変異 PrP が遺伝性プリオン病の病態にどのように関与しているのか解明されていない。今回、我々は、ある遺伝性プリオン病に関連した変異 PrP を発現する Tg(E199K) *Ngsk Prnp*<sup>0/0</sup> マウスでは、プルキンエ細胞の変性死が正常に回復することを明らかにした。つまり、変異 PrP(E199K) が正常機能を保持していることが明らかになった。さらに、遺伝性プリオン病の病態には、変異 PrP の機能異常ではなく、変異 PrP から異常型 PrP への構造変換が関与していることが示唆された。

#### [結論]

PrP の N 末領域はプルキンエ細胞の長期生存維持に必要である。

#### [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., Noda T.: Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted *PrP* gene. *Nature*. 380: 528-531, 1996
- 2) Nishida, N., Tremblay, P., Sugimoto, T., Shigematsu, K., Shirabe, S., Petromilli, C., Erpel, S. P., Nakaoke, 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
- 3) Scott M., Foster D., Mirenda C., Serban D., Coufal F., Waelchi M., Torchia M., Groth D., Carison G., DeArmond S. J., Westaway D., Prusiner S. B.: Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell*. 59: 847-857, 1989
- 4) Scott M., Groth D., Foster D., Torchia M., Yang S-L., DeArmond S. J., Prusiner S. B.: Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes. *Cell*. 73: 979-988, 1993
- 5) Muramoto T., DeArmond S. J., Scott M., Telling G. C., Cohen F. E., Prusiner S. B.: Heritable disorder resembling neuronal storage disease in mice expressing prion protein with deletion of an  $\alpha$ -helix. *Nat. Med.* 3: 750-755, 1997
- 6) Telling G. C., Haga T., Torchia M., Tremblay P., DeArmond S. J., Prusiner S. B.: Interactions between wild-type and mutant prion proteins modulate neurodegeneration in transgenic mice. *Genes Dev.* 10: 1736-1750, 1996
- 7) Brown D. R., Schulz-Schaeffer W. J., Schmidt B., Kretzschmar H. A.: Prion protein-deficient cells show

altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp. Neurol.* 146: 104-112, 1997

- 8) Slemerling D., Hegyi I., Fischer M., Blaettler T., Brandner S., Goetz J., Ruelicke T., Flechsig E., Cozzio A., von Mering C., Hangartner C., Aguzzi A., Weissmann C.: Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell.* 93: 203-214, 1998

[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

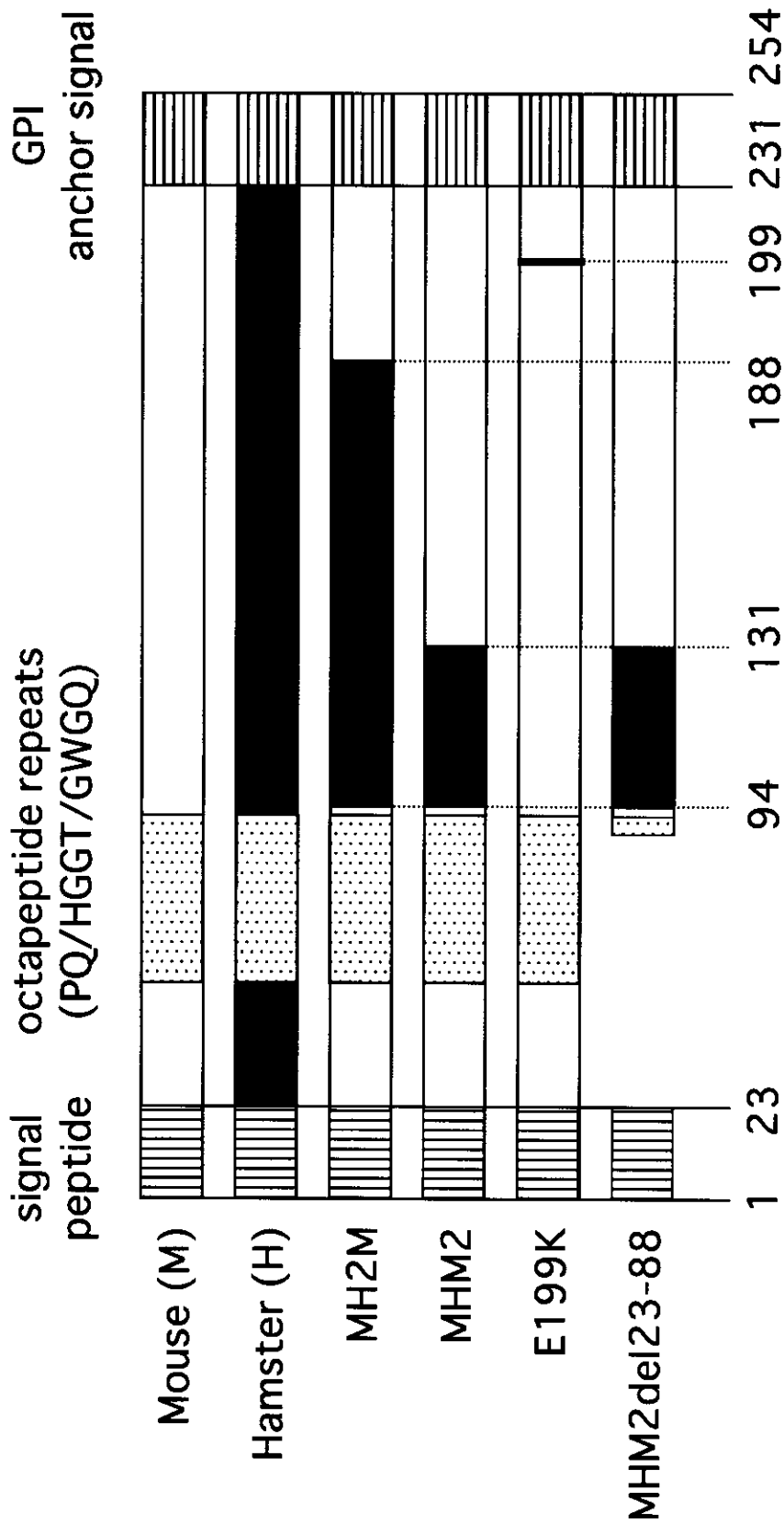


図1: Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup>マウスに導入したPrPトランスジェニックの構造。  
 MH2MとMHM2は、それぞれマウスとハムスターとのキメラPrPである。E199Kは、ヒト  
 遺伝性プリオン病にみられるPrPアミノ酸変異に相当するマウスPrP変異である。数字はア  
 ミノ酸番号。E: グルタミン酸; K: リジン

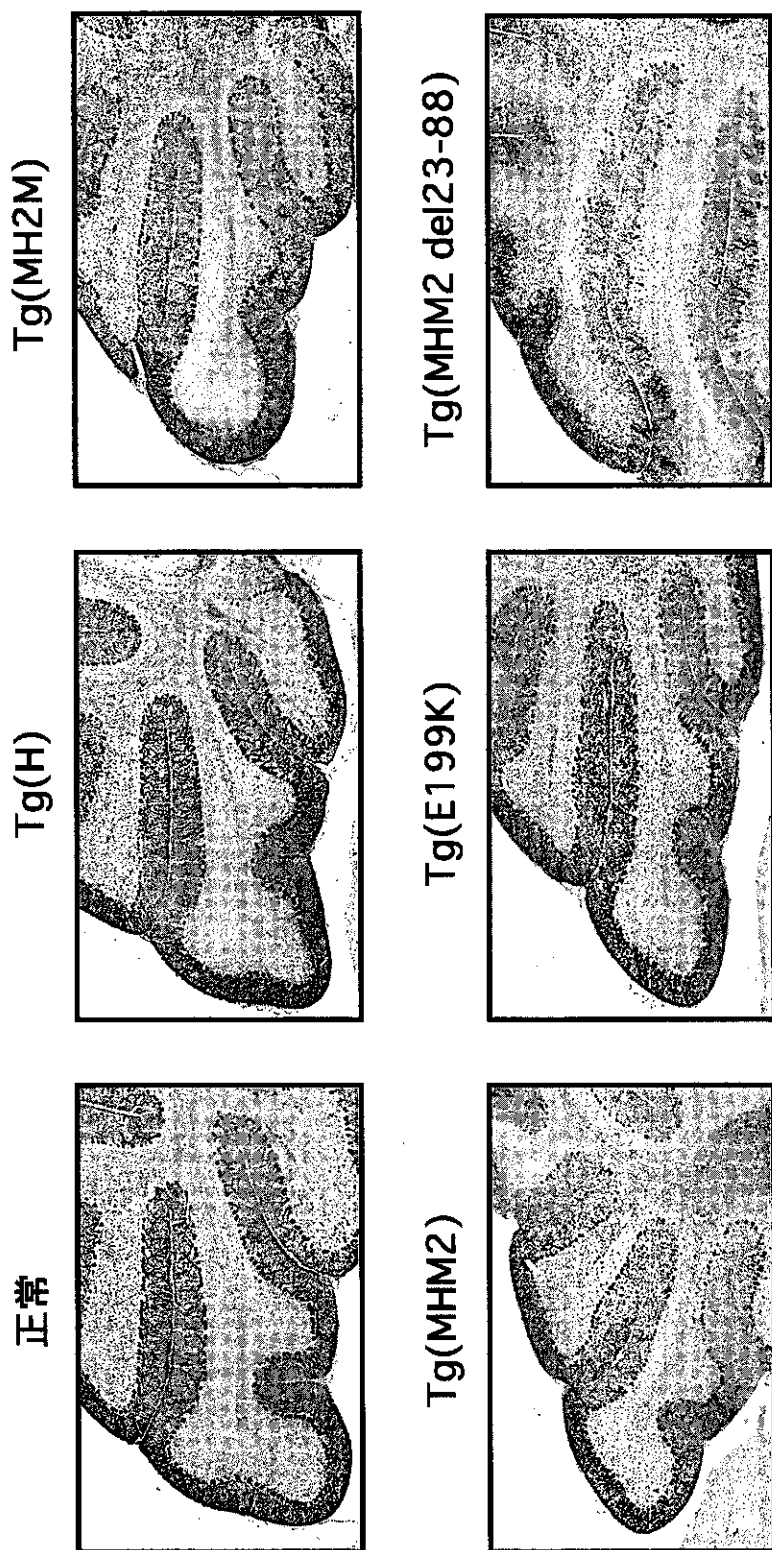


図2：各Tg(PrP) Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup>マウスにおけるプルキンエ細胞変性死。  
 Tg(H)、Tg(MH2M)、Tg(MHM2)、Tg(M-E199K) Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup>マウスではプルキンエ細胞は正常に回復していた。し  
 かし、Tg(MHM2 del23-88) Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup>マウスでは、著明なプルキンエ細胞の変性死が認められた。  
 (20月齢マウス小脳の抗 Spot35抗体による免疫染色像)

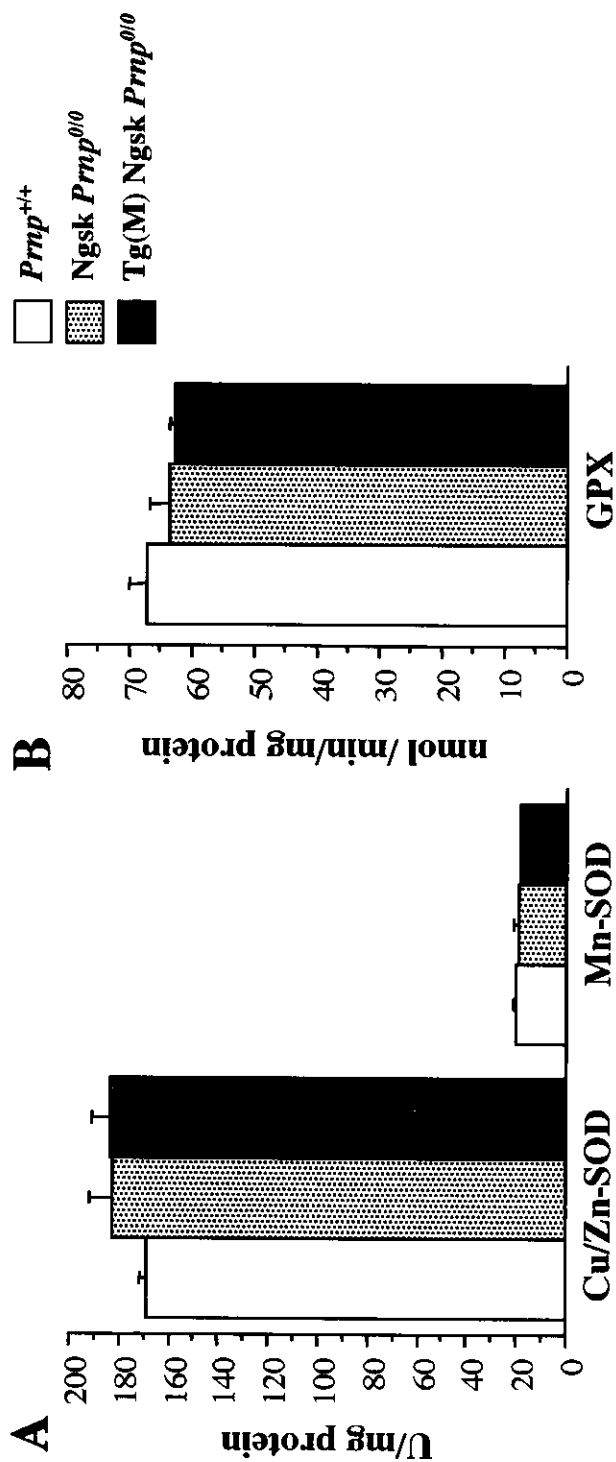


図3：各マウス脳内におけるsuperoxide dismutase (SOD)とglutathione peroxidase (GPX)活性。

*Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>*マウス脳内における銅および亜鉛依存性のCu/Zn-SODやマンガン依存性のMn-SOD活性は、正常マウス (*Prnp<sup>+/+</sup>*) やマウスPrP遺伝子を再導入した*Tg(M) Ngsk Prnp<sup>0/0</sup>*マウスと同様に正常であった。

# 非神経組織の蛋白分解抵抗性プリオン蛋白に関する研究

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、高橋 三津雄（福岡大学・薬・薬物治療学）

岩城 徹（九州大学・大学院医・脳研病理）

## 【研究要旨】

プリオン病以外で非神経組織におけるプリオン蛋白の蓄積は封入体筋炎の変性筋や白内障のレンズなどで以前から報告されているがその意義は明らかにされていない。プリオン蛋白の蓄積とライソゾーム機能異常の関係を *in vivo* で検討するために我々が作成した実験的クロロキンミオパシーでは、変性筋細胞の自己食胞内にプロテアーゼに部分抵抗を示し、界面活性剤に不溶性のプリオン蛋白が蓄積していた。このプリオン蛋白をハムスターに脳内接種したところ2年近く経過しても発症は見られていないが、脳内にはプロテアーゼ抵抗性を示すプリオン蛋白が認められた。したがって、このプリオン蛋白の性質は最近 Shaked らが報告したプリオン病罹患ヒト・動物の尿から検出されたプリオン蛋白の性質に類似していると考えられた。一方、我々は尿中の蛋白分解抵抗性プリオン蛋白について、ヒトプリオン病の診断マーカーとしての有用性を検討した。その結果、さらに例数や解析条件の検討を重ねる必要があるものの診断マーカーとして有望であることが示された。

## Research on the protease-resistant prion protein in the extraneuronal tissues

Katsumi DOH-URA<sup>1</sup>, Hisako FURUKAWA<sup>2</sup>, Mitsuo TAKAHASHI<sup>2</sup> and Toru IWAKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Neuropathology, Neurological Institute, School of Medical Sciences, Kyushu University

<sup>2</sup>Department of Clinical Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University

## ABSTRACT

The extraneuronal accumulation of prion protein (PrP) in non-prion diseases has been reported in some tissues such as degenerated muscle fibers of human inclusion body myositis and lenses of human cataract. Last year, we established the experimental chloroquine myopathy (ECM) in hamsters to examine properties of such PrP molecule accumulating in the extraneuronal tissue. We then demonstrated that the PrP molecule, which accumulated in the autophagic vacuoles of ECM, was partially PK-resistant and detergent-insoluble. This year we examined the disease-causing potentiality of this PrP molecule by the inoculation to the hamster brains. The hamsters inoculated with the homogenate of ECM muscle have been healthy and free from neuropathological changes for almost two years after inoculation, although the PrP molecule with the same biochemical properties as observed in ECM has already appeared in the brains. The findings suggest that the biochemical and biological properties of the PrP molecule of ECM resemble those of the PrP molecule isolated from the urine of prion-infected animals and human prion disease patients. Additionally, we have examined the usefulness of the protease-resistant PrP molecule in the urine as a diagnostic marker of human prion diseases. Preliminary data suggest that the detection of such PrP molecule in the urine is promising for its purpose.

## 【はじめに】

我々はライソゾーム機能異常とプリオン蛋白蓄積の関連に注目し、これまでにプリオン病罹患脳におけるライソゾーム関連蛋白分解酵素の増加やスクレイパー持続感染細胞にライソゾーム機能阻害薬剤を投与した場合の異常型プリオン蛋白生成抑制効果について明らかにしてきた。さらに *in vivo* で検討する



ために、ハムスターにクロロキン（ライソゾーム機能異常をおこす）を長期投与し、実験的クロロキンミオパチーを作製した。前年度までに我々はこのモデルにおいて変性筋細胞の自己貪食胞内にプリオン蛋白が蓄積し、このプリオン蛋白がプロテアーゼに部分抵抗性を示し、かつ界面活性剤に不溶性であること、さらにこの生化学的性質が脳内接種によって伝播されることを示した。このプリオン蛋白が接種個体に病気を起こすか否か、またプリオン感染において干渉作用を示すかを検討した。一方、このプリオン蛋白と同様な性質を持つ尿中プリオン蛋白について、その検出がプリオン病の診断において有用なマーカーとなるかどうかを検討した。

## 〔材料および方法〕

### クロロキンミオパチーモデルの解析

シリアンハムスターにクロロキン（50mg/kg/day）を 60 日間投与してミオパチーモデルを作成した。ミオパチー筋乳剤（10% in saline）20 $\mu$ l を 6 週齢ハムスターに脳内接種し 2 年間近く観察した。また変性筋に蓄積したプリオン蛋白の通常プリオンによるプリオン蛋白変換に対する干渉作用を検討するためにミオパチー筋乳剤をあらかじめ脳内投与し 4 週間後に 263K スクレイピー株を腹腔内接種した。コントロール群には正常筋乳剤を脳内投与した。それぞれの潜伏期間と病理像を比較検討した。

### ヒトプリオン病の尿中プリオン蛋白解析

臨床的に probable sporadic CJD と診断された 7 例と遺伝子診断がなされた GSS<sup>102</sup> 2 例の尿中プリオン蛋白をウエスタンブロット法で解析した。疾患コントロールとして 44 歳から 79 歳までの 11 症例（内訳は表 1 に示す）を、また正常コントロール 12 例を解析した。サンプルの調整は Shaked らの方法を参考にした。随時尿を採取後凍結または冷蔵で保存し、十分量の生理食塩水または PBS で 1 晩透析後 100,000xg 1 時間の超遠心により得られた沈殿をプロテナーゼ K 40 $\mu$ g/ml で 1 時間消化し、ウエスタンブロット法で解析した。得られたシグナルの特異性は吸収抗体および 2 次抗体のみの反応との比較で確認した。

### （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。また、患者及び健常者からの検体提供にあたっては、研究の内容、検体の保管、検査データの取扱いや保管についての十分な説明を本人あるいは患者家族に行い同意を得た。

## 〔結 果〕

### クロロキンミオパチーに蓄積したプリオン蛋白の病原性

ハムスターに脳内接種し 2 年間近く観察しているが臨床的にも神経病理学的にも接種個体に異常な所見は見られず、これまでのところクロロキンミオパチーに蓄積したプリオン蛋白に病原性は確認されていない。

### 正常型から異常型プリオン蛋白への in vivo での変換における干渉作用

263K スクレイピー株腹腔内接種に先立ってこのプリオン蛋白を脳内投与し、潜伏期間や病理像を観察したが、コントロール筋乳剤投与群と差はなく、in vivo での変換に対して干渉作用を示さないことが明らかになった。

### 尿中プリオン蛋白の解析

散发性 CJD : probable CJD 7 例のうち、5 例でプロテアーゼ抵抗性 PrP が検出された。明らかな PrP<sup>C</sup> が検出されなかった 2 症例はいずれも凍結尿のみが利用可能であった。プロテアーゼ抵抗性 PrP が見られた 5 例中の 2 例は凍結尿のみ解析可能であり、シグナルは冷蔵尿に比べて弱くフラグメントサイズも異なっていた。冷蔵尿で解析し得た 3 例ではいずれも 42kd のプロテアーゼ抵抗性シグナルが得られた。

GSS<sup>102</sup> : 解析した 2 例の尿はいずれも凍結保存されており、このうち 1 例で 37kd と 27kd のプロテアーゼ抵抗性 PrP が検出された。

正常コントロール: ボランティア 12 人から随時尿を採取した。新鮮尿を解析した 8 例では 30 から 100kd のあいだに複数のシグナルがみられ、プロテイナーゼ K 処理にて完全に消化された。凍結保存をした 4 例では PrP<sup>C</sup> のシグナルは他の 8 例に類似したが、プロテアーゼにより消化されない 32kd 付近のシグナルが残った。

疾患コントロール: 新鮮尿あるいは冷蔵尿で解析し得た症例 1 から 8 については正常コントロールと同様な PrP<sup>C</sup> のシグナルを認め、症例 1～7 ではプロテアーゼ感受性であったが症例 8 では 32kd のシグナルが消化されずに残った。症例 9～10 は凍結尿で解析を行い、PrP<sup>C</sup> のシグナルが得られなかった。

#### 尿検体の保存方法の検討

新鮮尿では安定して PrP<sup>C</sup> が検出できたが、凍結尿では冷蔵に比較して PrP<sup>C</sup> の保存が劣っていた。また、尿を凍結すると解凍後に多量の debris が出現した。採尿後当日中に debris を除いて上清にしたものは冷蔵保存で約 1 ヶ月間まで安定してプリオン蛋白が検出できたが、約 120kd のバンドが新たに加わった。

#### 【考 察】

クロロキンは生体内ではライソゾーム内に濃縮されてその内部の pH 環境を変化させ、長期投与により骨格筋に自己貪食胞を伴うミオパチーを生じることが知られている。この自己貪食胞内には Aβ 蛋白をはじめとする Alzheimer 病関連蛋白の蓄積が報告されており、また類似の病理像を持つ封入体筋炎の自己貪食胞には正常型プリオン蛋白が蓄積することが知られている。ライソゾーム機能と異常型プリオン蛋白生成の関連を *in vivo* で検討するために我々はハムスターを用いて実験的クロロキニンミオパチーを作製し、自己貪食胞内にプリオン蛋白の蓄積を見出した。このプリオン蛋白は①プロテアーゼに部分抵抗性であり、②界面活性剤に不溶性で、③プロテアーゼ抵抗性は *in vivo* で伝播可能であるが、④これまでに病原性は確認できておらず、⑤*in vivo* での正常型から異常型へのプリオン蛋白変換に干渉しないことが明らかになった。これらのことから、正常型が異常型の性質を獲得していく過程にはいくつかの中間状態がありこの過程にはライソゾーム機能異常が関与していると考えられた。

2001 年に Shaked らは BSE 罹患牛やスクレイピー感染ハムスター、さらにヒト CJD<sup>200</sup> の尿から、プリオン蛋白を検出し得たことを報告した。この尿中プリオン蛋白はプロテアーゼ抵抗性で脳内接種により脳内プリオン蛋白にプロテアーゼ抵抗性を付与するが感染性はなく、クロロキニンミオパチーで蓄積するプリオン蛋白に類似した性格を示した。今回我々はヒトプリオン病における尿中プロテアーゼ抵抗性プリオン蛋白の診断的意義を検討した。その結果、尿中プリオン蛋白の検出には検体の保存状態が重要であることがわかった。新鮮あるいは冷蔵尿ではプリオン蛋白は容易に検出されるが、凍結保存したものでは困難であった。冷蔵保存されたものについては probable CJD 全例で 42kd のプロテアーゼ抵抗性シグナルが認められ、正常コントロールでは 30-100kd の複数のシグナルとして PrP<sup>C</sup> が検出されが、これらはプロテアーゼで消化された。疾患コントロールでは 1 例を除いて正常コントロールと同様の結果が得られた。GSS<sup>102</sup> の 2 例では 1 例でプロテアーゼ抵抗性プリオン蛋白が検出されたがこのパターンは CJD と異なり、32kd と 27kd のプロテアーゼ抵抗性シグナルが見られた。以上よりヒトプリオン病の診断に有用であると考えられたが、病型によるパターンの差異やシグナルの出現時期、採尿条件などについては今後症例を重ねて検討する必要がある。

#### 【参考文献】

Doh-ura K, Iwaki T, Caughey B. : Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. *J Virol.* 74:4894-7, 2000

Shaked GM, Shaked Y, Kariv-Inbal Z, Halimi M, Avraham I, and Gabizon R. : A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases. *J Biol Chem.* 276:31479-31482, 2001

【研究発表】

1. 論文発表

- 1) Kawashima M., Suzuki S.O., Doh-ura K., Iwaki T. :  $\alpha$ -Synuclein is expressed in a variety of brain tumors showing neuronal differentiation. *Acta Neuropathol.* 99:154-160, 2000
- 2) Kawashima T., Furuta A., Doh-ura K., Kikuchi H., Iwaki T.: Ubiquitin-immunoreactive skein-like inclusions in the neostriatum are not restricted to amyotrophic lateral sclerosis, but are rather aging-related structures. *Acta Neuropathol.* 100:43-49, 2000
- 3) 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
- 4) Kawashima T., Doh-ura K., Kikuchi H., Iwaki T. :Cognitive dysfunction in patients with amyotrophic lateral sclerosis is associated with spherical or crescent-shaped ubiquitinated intraneuronal inclusions in the parahippocampal gyrus and amygdala, but not in the neostriatum. *Acta Neuropathol.* 102:467-472, 2001

2. 学会発表

- 1) 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、2001年、札幌
- 2) 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、2001年、大阪

表1 疾患コントロール群

	年齢	性	疾患名
1)	76	F	多発性脳梗塞 神経因性膀胱 高血圧 慢性心不全
2)	73	M	血管性パーキンソニズム 糖尿病
3)	62	F	ラクナ梗塞 高脂血症
4)	67	M	糖尿病
5)	74	F	肺炎
6)	69	F	糖尿病
7)	77	M	脳梗塞
8)	75	F	脳梗塞 糖尿病
9)	61	F	筋萎縮性側索硬化症
10)	71	F	重症筋無力症
11)	74	M	脳梗塞

表2 プリオン病症例

	発症年齢	発症から採尿まで(月)	尿の保存方法	蛋白分解抵抗性 PrP
<b>Probable CJD</b>				
1	58	2	4°Cおよび-20°C	+
2	66	6	4°Cおよび-20°C	+
3	46	11	4°Cおよび-20°C	+
4	67	2	-20°C	+
5	75	2.5	-20°C	+
6	82	3	-20°C	-
7	52(硬膜例)	36	-20°C	-
<b>GSS<sup>102</sup></b>				
1	72	28	-20°C	+
2	48	36	-20°C	-

図1 probable CJD でみられた尿中プリオン蛋白

