

厚生労働科学研究費補助金
(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14年度 総括・分担研究報告書

平成 15 年 3 月

主任研究者 片 峰 茂

はじめに

平成14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 15 年 3 月

主任研究者 片 峰 茂

目 次

I. 総括研究報告書

- 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 …… 1
～プリオン類似蛋白遺伝子と疾患感受性遺伝子～
長崎大・院医・感染分子病態学 片 峰 茂

II. 分担研究報告書

1. プリオン蛋白欠損マウスの神経変性における …… 7
プリオン類似蛋白 (PrPLP/Dpl) の役割
長崎大・院医・感染分子病態学 片 峰 茂
2. 特発性プリオン病の疾患感受性因子及びプリオン …… 14
蛋白相互作用因子に関する研究
九州大・院医・脳研病理 堂 浦 克 美
3. プリオン感受性・非感受性細胞を用いた …… 19
プリオン増殖関連因子の探索
帯広畜産大・原虫研・獣医公衆衛生 堀 内 基 広

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 …… 23

IV. 研究成果の刊行物・別刷 …… 25

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 医歯薬学総合研究科 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

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：片 峰 茂（長崎大・大学院医歯薬学総合研究科・教授）

研究要旨

(1) 長崎大学で作製したプリオン蛋白欠損 (N^{gsk} Prnp^{0/0}) マウスには加齢にともない小脳プルキンエ細胞変性死の機構を解明するために、PrP^Cの機能は消失しているがPrPLP/Dplを発現しない別系統のZrch I Prnp^{0/0}マウスに、神経細胞またはプルキンエ細胞特異的にPrPLP/Dplを発現するトランスジーンを導入した。その結果、プルキンエ細胞変性死がPrPLP/Dplの過剰発現によって起こり、またPrP^Cが発現量依存的にこの神経細胞変性作用を阻害することが判明した。(2) 特発性クロイツフェルト・ヤコブ病19例と対照健常者群51例について補体関連遺伝子の多型を検討し、C1qRp遺伝子において疾患群と対照群とで有意に異なる遺伝子多型を認めた。(3) プリオン蛋白との結合能を有する分子として、プリオン持続感染細胞のラフトに特異的に存在する約100 kDa蛋白質分子1種と存在しない約220 kDaタンパク質分子1種の存在を明らかにした。(4) プリオン感受性・非感受性細胞を識別するための方法を確認して、3種のマウス株化細胞を感受性・非感受性に分類した。また、I3/I5プリオン持続感染細胞は培養条件の変更によりプリオン増殖を許容しなくなることから、プリオンの増殖を許容するI3/I5との間で、遺伝子発現の比較解析を行った。これまでに、プリオン増殖を許容するI3/I5細胞で発現が高い、計81の遺伝子断片を同定した。

分担研究者

堂 浦 克 美（九州大・院医・助教授）
堀 内 基 広（帯広畜産大・原虫病センター・助教授）

A. 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同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。

- ・ 遺伝子改変マウスを用いてDpl/PrPLPの生理機能を解明する。
- ・ 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。
- ・ 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。
- ・ 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。
- ・ 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。

・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探索、プリオン蛋白相互作用因子の探索、及び(4) プリオン感受性・非感受性細胞を用いたプリオン増殖関連因子の探索、を行ったので報告する。

B. 研究方法

(1) Dpl/PrPLPによる神経変性死の分子機構の解析

長崎大学で作製したプリオン蛋白欠損 (N_{gsk} Prnp^{0/0}) マウスには加齢にともない小脳プルキンエ細胞変性死が惹起される。我々はこれまでの研究により、この神経変性にはプリオン蛋白 (PrP^C) の正常機能消失とPrP類似蛋白 (PrP-like protein, PrPLP/Dpl) の過剰発現の両者が関与する可能性を示した。このことを証明するために、PrP^Cの機能は消失しているがPrPLP/Dplを発現しない別系統のZrch I Prnp^{0/0}マウスのbackgroundに、神経細胞またはプルキンエ細胞特異的にPrPLP/Dplを発現するトランスジェニックマウスTg(PrPLP/Dpl).Zrch I Prnp^{0/0}を作製し、プルキンエ細胞変性死がおこるか否かを検討した。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。これらマウスをZrch I Prnp^{0/0}マウスと交配し、Tg(NSE-PrPLP/Dpl) Zrch I Prnp^{0/0}、Tg (NSE-PrPLP/Dpl) Zrch I Prnp^{0/+}、Tg (NSE-PrPLP/Dpl)Zrch I Prnp^{+/+}、Tg (PCP2-PrPLP/Dpl) Zrch I Prnp^{0/0}、Tg

(PCP2-PrPLP/Dpl) Zrch I Prnp^{0/+}、Tg (PCP2-PrPLP/Dpl) Zrch I Prnp^{+/+}の合計9系統のマウスを得た。

(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探索

九州大学脳研病理教室において剖検された特発性クロイツフェルト・ヤコブ病症例の凍結脳または一般臓器から抽出したDNA、およびプリオン病が疑われ、プリオン蛋白遺伝子の変異を解析するために提供された試料から、後に剖検により特発性クロイツフェルト・ヤコブ病が確定した19例について検討した。対照として、九州大学遺伝情報実験施設で収集された健常者群の試料から51例を検討した。

C3レセプターであるCR1、CR2と、C1qレセプターであるC1qBPおよびC1qRpの蛋白質コード領域をPCR法にて増幅した。clusterinについても、全てのエクソン領域を増幅した。PCR産物を鋳型にしてジデオキシ法でシーケンス反応を行い、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、断片長多型を調べた。

(3) プリオン蛋白相互作用因子の探索

正常型のマウス組換え体プリオン蛋白(121-231)を精製し、ビオチン標識したものをアビジン磁気ビーズに結合させ、プリオン蛋白アフィニティカラムを作製した。非感染細胞で正常型プリオン蛋白が発現しているマウスの神経芽細胞腫細胞 (N2a) と感染細胞で異常型プリオン蛋白が常時発現しているマウスの神経芽細胞腫細胞 (N2aSc) の生合成タンパク質をアイソトープラベルした後、細胞を1% Triton X-100で溶解し、密度勾配遠心法にてプリオン蛋白を含むラフト画分を分画した。これらのラフト画分をプリオン蛋白アフィニティカラムと混合し、結合反応を行った。溶出は段階的に塩濃度を上昇させることによって行い (200、400、600、800 mM NaCl)、得られた溶出液を10% SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動によって展開し、感染と非感染細胞間での泳動パターンを比較した。

(4) プリオン感受性・非感受性細胞を用いたプリオン増殖関連因子の探索

ヒトelongation factorプロモーター下流にマウスPrPORFをコードする遺伝子断片を挿

入して、真核細胞発現ベクターpEF-MoPrPを構築した。pEF-MoPrPを各種細胞株（マウス神経芽腫細胞N2aおよびNB41A3、筋芽細胞G8およびNOR10、肝細胞NMuLi、副腎皮質由来細胞Y1）に導入してネオマイシン耐性細胞を選抜し、限界希釈法によりクローンを得た。PrP^Cの発現量はウエスタンブロット(WB法)で確認した。各種細胞株のプリオン感受性を検討するために、I3/I5プリオン持続感染細胞をPrP^C過発現細胞株と共培養してネオマイシン存在下で2週間以上連続継代した。ネオマイシン添加培地で培養することで、共培養中のI3/I5は死滅してPrP^C過発現細胞のみが生存する。細胞内PrP^{Sc}は、セラライゼートをPKで消化後に、WB法により検出した。

I3/I5プリオン持続感染細胞を培地組成を変えて培養し、PrP^{Sc}の産生におよぼす影響をWB法にて解析した。PrP^{Sc}を産生する細胞株、および産生しなくなった細胞株の乳剤をICRマウスに脳内接種して、PrP^{Sc}の消失に伴う感染性の変化を調べた。遺伝子発現の比較解析は、cDNA固相化マイクロビーズを用いた網羅的遺伝子発現解析法(MPSS)により解析した。

(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。遺伝子解析については「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて研究を行った。

C/D. 研究結果と考察

(1) Dpl/PrPLPによる神経変性死の分子機構の解析

Tg (NSE-PrPLP/Dpl) Zrch I *Prnp*^{0/0}マウス (n=10) は339±31日で全て小脳失調性歩行を呈した。また、Tg (NSE-PrPLP/Dpl) Zrch I *Prnp*^{0/+}マウス (n=31) も、435±131日から失調性歩行を呈しはじめた。しかし、Tg (NSE-PrPLP/Dpl) Zrch I *Prnp*^{+/+}マウス (n=1) は、生後700日経過してもそのような症状を呈しなかった。また病理学的検索にて、失調性歩行を呈したTg (NSE-PrPLP/Dpl) Zrch I *Prnp*^{0/0}とTg (NSE-PrPLP/Dpl) Zrch I *Prnp*^{0/+}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が、Tg (NSE-

PrPLP/Dpl)Zrch I *Prnp*^{+/+}マウスではプルキンエ細胞は正常であった。同様に、Tg (PCP2-PrPLP/Dpl)Zrch I *Prnp*^{0/0}マウス (n=5) とTg (PCP2-PrPLP/Dpl)Zrch I *Prnp*^{0/+}マウス (n=23) は、それぞれ277±14日と400±208日から失調性歩行をはじめ、病理学的検索にてプルキンエ細胞変性を呈した。しかし、Tg (PCP2-PrPLP/Dpl)Zrch I *Prnp*^{+/+}マウスは、生後約560日経過しても、このような異常は認められなかった。

(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

C1qRpにおいて、P559S、M662V (数字は、アミノ酸通し番号) の二つのアミノ酸置換を伴う遺伝子多型を認めた。P559S多型は、疾患群でS/S 9例(60%)、S/P 3例(20%)、P/P 3例(20%)であり、対照群でS/S 21例(45.7%)、S/P 23例(50%)、P/P 2例(4.3%)であった。両群間でカイ二乗検定を行ったところ、p=0.044で有意差を認めた。プリオン病感染因子の経口的、あるいは血液を介した伝播・発症には、脾臓、リンパ装置など網内系が関与している。C1qもまた、補体系の一員として腹腔内投与後のプリオン病感染因子の伝播に関与している。今回確認された遺伝子多型は、レセプターの機能部位の提示に関わる領域とされており、レセプターとしての機能に影響を及ぼすことでプリオン病発症に関与している可能性がある。

(3) プリオン蛋白相互作用因子の探索

細胞内環境を考慮し、pH 5.4, 6.0, 7.2の条件で結合反応を行ったが、結合が認められたのはpH 7.2の時であった。感染細胞抽出物を供した600~800 mM NaClの溶出画分で約100 kDaのバンドが認められた。一方、非感染細胞の600~800 mM NaClの溶出画分では、約220 kDaのバンドが認められ、プリオン蛋白と結合する感染・非感染細胞間で異なった分子の存在を発見した。

(4) プリオン感受性・非感受性細胞を用いたプリオン増殖関連因子の探索

I3/I5とPrP^C過発現ネオマイシン耐性細胞株を共培養して、ネオマイシン添加培地で連続継代した。N2aは共培養によりPrP^{Sc}陽性となった。この結果は、共培養によりプリオンがI3/I5からN2aに伝達され、N2aで増殖することを意味している(図1)。同様の伝達試

験を他の細胞株を用いて行なったところ、NOR10、NMuLi (図1) およびG8 (結果は示さず) では、PrP^{Sc}陽性とはならなかった。以上の結果は、N2a細胞はプリオン増殖を許容する、つまりプリオン感受性であるが、NOR10、NMuLiおよびG8はプリオン非感受性細胞であることを示唆している。

また、I3/I5はOpti-MEM-10%FBSで維持・培養すると、PrP^{Sc}は長期に渡り維持されるが、その培地をD-MEM-4%FBSに変更すると、PrP^{Sc}の産生は急速に減少して数代の継代後にはPrP^{Sc}は検出されなくなることを見いだした。培養条件の変化によりI3/I5細胞でプリオンが増殖できなくなることから、Opti-MEM-10%FBSで培養したI3/I5(OP-I3/I5)とD-MEM-4%FBSで培養したI3/I5(DM-I3/I5)の間で遺伝子発現レベルの変化をMPSS法により解析した。その結果、現在までに、DM-I3/I5で発現が高い遺伝子のうち、MPSS解析で複数回出現したものが43断片、一回出現したものが38断片、得られている。

E. 結 論

- (1) プルキンエ細胞でのPrPLP/Dplの異所性発現は、プルキンエ細胞変性死を誘導し、PrP^CはPrPLP/Dplの神経変性作用を発現量依存性に阻害することが判明した。
- (2) これまでに検索した補体関連遺伝子の中では、C1qRp遺伝子において疾患群と対照群とで有意に異なる遺伝子多型を認めた
- (3) プリオン蛋白との結合能を有する分子として、プリオン持続感染細胞のラフトに特異的に存在する約100 kDa蛋白質分子1種と存在しない約220 kDaタンパク質分子1種の存在を明らかにした。
- (4) プリオン感受性・非感受性細胞を識別するための方法を確立して、3種のマウス株化細胞を感受性・非感受性に分類した。また、I3/I5プリオン持続感染細胞は培養条件の変更によりプリオン増殖を許容しなくなることから、プリオンの増殖を許容するI3/I5との間で、遺伝子発現の比較解析を行った。これまでに、プリオン増殖を許容するI3/I5細胞で発現が高い、計81の遺伝子断片を同定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sasaki K, Doh-ura K, Ironside WJ, Iwaki T : Increased clusterin (apolipoprotein J) expression in human and mouse brains infected with transmissible spongiform encephalopathies. *Acta Neuropathol* 103:199-208, 2002

Horiuchi, M., Nemoto, T., Ikeda, T., Muramatsu, Y., Furuoka, H., Matsui, T., Mohri, S. and Shinagawa, M. Biological and biochemical properties of sheep scrapie agents in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, 40(9): 3421-3426, (2002).

Takekida, K., Kikuchi, Y., Yamazaki, T., Horiuchi, M., Kakeya, T., Shinagawa, M., Takatori, K. Tanimura, A., Tanamoto, K. and Sawada, J. Quantitative analysis of prion protein by immunoblotting. *J. Health Science*, 48(3): 288-291 (2002).

Ishiguro, N., Nakajima, A., Horiuchi, M. and Shinagawa, M. Multiple nuclear pseudogenes of mitochondrial DNA exist in the canine genome. *Mammalian Genome* 13: 365-372 (2002).

Gombojav A., Ishiguro, N., Horiuchi, N., Serjmayadag, D., Byambaa, B., and Shinagawa, M. Amino acid polymorphisms of PrP gene in Mongolian sheep. *J. Vet. Med. Sci.* 65(1): 75-81 (2003).

西田教行、片峰茂：プリオン病の分子機序「特集・ニューバリエントクロイツフェルトーヤコブ病」 化学療法の領域 18巻5号、19-25、2002

片峰茂：プリオン類似分子—Doppel— 121回日本医学会シンポジウム「プリオン病」記録集、日本医学会、pp65-70、2002

堀内基広(2002) プリオンの検出技術 臨床検査 46(12) 1545-1551.

堀内基広(2002) プリオン蛋白質とプリオン病 栄養生理研究会報 46(1): 45-50.

2. 学会発表

Katamine S: Biological divergence among prion strains in cell culture models. In The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Island, August 24-27, 2002

Doh-ura K, et al : Intraventricular infusion of PPS: an immediately available therapy for TSEs. International Conference on TSEs, Edinburgh, 2002

Kubo I, Doh-ura K, et al : Chemicals with a quinoline ring are potent inhibitors of abnormal prion protein formation. International Conference on TSEs, Edinburgh, 2002

Ishikawa K, Doh-ura K, et al : BSB as a therapeutic and diagnostic chemical for TSEs. International Conference on TSEs, Edinburgh, 2002

Sasaki K, Doh-ura K, et al : Clusterin / apolipoprotein J is associated with accumulation of prion protein in the follicular dendritic cells. International Conference on TSEs, Edinburgh, 2002

Doh-ura K, et al : Intraventricular infusion of PPS as an immediately applicable treatment for prion diseases. International Conference New Perspectives for Prion Therapeutics, Paris, 2002

片峰茂：プリオン蛋白欠損マウスにおける神経変性分子機構とプリオン類似蛋白、シンポジウム「プリオン病の最前線」、第133回日本獣医学会学術集会、専修大学（神奈川）、2002年3月29日

片峰茂：プリオン類似分子—Doppel—、第121回日本医学会シンポジウム「プリオン病」、箱根、2002年8月31日

片峰茂：プリオン蛋白とプリオン病の分子機構（特別講演）、第55回日本寄生虫学会南日

本支部大会／第52回日本衛生動物学会南日本支部大会、長崎大学医学部、2002年10月26日

山口尚宏、坂口末廣、重松和人、西田教行、新竜一郎、有馬和彦、片峰茂：プリオン淡白遺伝子ノックアウトによるPurkinje細胞変性死の分子機構、ワークショップ「遺伝子変異動物を用いた行動制御遺伝子の解析：遺伝子変異と行動異常」、第25回日本分子生物学会年会、横浜市、2002年12月12日

渡辺健、西田教行、小林信之、坂口末廣、片峰茂：PrPのpost-translational modification、第50回日本ウイルス学会学術集会・総会、札幌市、2002年10月18日

有馬和彦、西田教行、山口尚宏、新竜一浪、坂口末廣、重松和人、片峰茂：プリオン淡白の高次構造とプリオン株の生物学的性質、第50回日本ウイルス学会学術集会・総会、札幌市、2002年10月18日

堂浦克美：プリオン病の治療薬剤の開発。第75回日本生化学会大会、2002年、京都

狩野 綾子、堀内 基広、石黒 直隆、品川 森一、古岡 秀文、木村 久美子：モノクローナル抗体6H10の解析：PrP^{Sc}特異的抗体の可能性 第133回日本獣医学会学術集会（東京）2002年4月

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133回日本獣医学会学術集会（東京）2002年4月

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：抗PrPモノクローナル抗体パネルの作製と抗体によるPrP^{Sc}産生阻害 第133回日本獣医学会学術集会（東京）2002年4月

堀内 基広、石黒 直隆、品川 森一、古岡 秀文、北村 延夫：経口ルートによるプリオンの感染成立には消化管リンパ装置の存在が必要である 第50回日本ウイルス学会学術集会（札幌）2002年10月

工藤 聡子、堀内 基広、石黒 直隆、品川
森一、横山 隆、梅谷 淳、松井 利生、柳
谷 孝幸：免疫生化学的BSE診断技術の感
度・操作性の改良 第50回日本ウイルス学会
学術集会（札幌）2002年10月

田村 勇耕、堀内基広、古岡 秀文、石黒直
隆、品川森一：尿崩症を誘発するマウス馴化
スクレイピー株の分離 第50回日本ウイルス
学会学術集会（札幌）2002年10月

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

堂浦克美、久保郁子「病原性プリオンタンパ
ク質生成阻害剤およびその使用方法」、特許
願2002-265321、2002年

品川森一、堀内基広、梅谷淳（出願人：帯広
畜産大学学長、富士レビオ株式会社）「抗異
常型プリオンモノクローナル抗体及びの製造
方法並びにそれを用いた異常型プリオンタン
パク質の免疫測定方法」特願2002-129003

分 担 研 究 報 告

プリオン蛋白欠損マウスの神経変性における プリオン類似蛋白 (PrPLP/Dpl) の役割

分担研究者 片 峰 茂 （長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 教授）
研究協力者 坂 口 末 廣、山 口 尚 宏、重 松 和 人
（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科）

研究要旨

長崎大学で作製したプリオン蛋白欠損 (Ngsk *Prnp*^{0/0}) マウスには加齢にともない小脳プルキンエ細胞変性死が惹起される。我々はこれまでの研究により、この神経変性にはプリオン蛋白 (PrP^C) の正常機能消失とPrP類似蛋白 (PrP-like protein, PrPLP/Dpl) の過剰発現の両者が関与する可能性を示した。このことを証明するために、PrP^Cの機能は消失しているがPrPLP/Dplを発現しない別系統のZrch I *Prnp*^{0/0}マウスのbackgroundに、神経細胞またはプルキンエ細胞特異的にPrPLP/Dplを発現するトランスジェニックマウスTg(PrPLP/Dpl).Zrch I *Prnp*^{0/0}を作製し、プルキンエ細胞変性死がおこるか否かを検討した。その結果、これらのTg(PrPLP/Dpl).Zrch I *Prnp*^{0/0}マウスは全て小脳失調性歩行を来しプルキンエ細胞変性死を呈した。また、これに遅れて、Tg(PrPLP/Dpl) Zrch I *Prnp*^{0/+}マウスでもプルキンエ細胞変性死が認められた。しかし、Tg(PrPLP/Dpl) Zrch I *Prnp*^{+/+}マウスでは現在のところプルキンエ細胞変性死は認められなかった。つまり、これらの結果は、*Prnp*^{0/0}マウスに認められたプルキンエ細胞変性死がPrPLP/Dplの過剰発現によって起こり、またPrP^Cが発現量依存的にPrPLP/Dplの神経細胞変性作用を阻害することを示した。

A. 研究目的

我々が作成したプリオン蛋白欠損 (Ngsk *Prnp*^{0/0}) マウスは、生後約1年すると小脳プルキンエ細胞変性死を伴う失調性歩行を呈した¹⁾。この神経学的異常は、プリオン蛋白 (PrP) 遺伝子を再導入することで回復することから、正常型プリオン蛋白 (PrP^C) の機能はプルキンエ細胞の生存維持に必要であることがわかった²⁾。しかし、他の教室で作成されたZrch I *Prnp*^{0/0}マウスではプルキンエ細胞変性死は認められず³⁾、なぜこのような差異が生じるか長年不明であった。最近、我々とカナダのグループはそれぞれ独自に、PrP遺伝子の下流にPrP類似蛋白 (PrP-like protein, PrPLP/Dpl) をコードする遺伝子を発見した^{4, 5)}。また興味深いことに、PrPLP/Dpl遺伝子がNgsk *Prnp*^{0/0}マウスでは過剰発現していたが、Zrch I *Prnp*^{0/0}マウスではこのような過剰発現は認められなかった^{4, 5)}。これらの結果から、プルキンエ細胞変性

死にはPrP^Cの機能消失とPrPLP/Dplの過剰発現との両方が必要であることが示唆された。そこで我々はこのことを明らかにするために、Zrch I *Prnp*^{0/0}マウスのbackgroundにPrPLP/Dpl遺伝子を過剰発現するトランスジェニック (Tg(PrPLP/Dpl)Zrch I *Prnp*^{0/0}) マウスを作製し、プルキンエ細胞変性死がおこるかどうかを検討した。

B. 研究方法

1) トランスジェニックマウスの作製

neuron-specific enolase (NSE)のプロモーターの下流に、PrPLP/DplのOpen reading frame (ORF)とSV40のpoly A signalを有するコンストラクトNSE-PrPLP/Dplを作製した(図1)。また、Purkinje cell protein (PCP)-2のプロモーターの下流に、PrPLP/DplのORFとPCP-2のpoly A signalを持つコンストラクトPCP2-PrPLP/Dplを作成した(図1)。これらのコンストラクトをC57BL/6の受精卵に注

入した後、常法に従いTg(NSE-PrPLP/Dpl)マウスとTg(PCP2-PrPLP/Dpl)マウスを作製した。さらに、これらのマウスをそれぞれZrch I *Prnp*^{0/0}マウスと交配させ、Tg(NSE-PrPLP/Dpl)Zrch I *Prnp*^{0/0}、Tg(NSE-PrPLP/Dpl)Zrch I *Prnp*^{0/+}、Tg(PCP2-PrPLP/Dpl)Zrch I *Prnp*^{0/0}、Tg(PCP2-PrPLP/Dpl)Zrch I *Prnp*^{0/+}マウスを確立した。

2) *in situ* hybridization

マウス脳を4%パラホルムアルデヒド(pH7.4)で16時間固定し、パラフィンにて包埋した後、5 μ m厚の切片を作製した。脱パラフィン後、この切片を8mg/mlのペプシンとproteinase Kで10分、37°Cで処理し、0.25% acetic anhydride/0.1 mM triethanolamine hydrochloroide (pH 8.0)/0.9% NaClで洗浄した。ハイブリダイゼーションは、50% formamide/10 mM Tris-HCl [pH7.5]/1mM EDTA/0.6M NaCl/0.5mg/ml yeast tRNA/0.25mg/ml salmon sperm DNA/1% skim milk/0.25% SDS/5x Denhart's solutionにて50°C、16時間行った。その後、4xSSCにて数回洗浄し、さらに50% formamide/2xSSCにて50°C、30分間洗浄した。シグナルはanti-DIG FabのついたアルカリフォスファターゼとNBT/BCIP (nitro blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)を用いたenzyme-linked immunosorbent assayにて検出した。

3) プローブの作製

PrPLP/DplのORFを含む領域をpBluescriptにてクローニングし、T7またはT3 polymeraseにてdigoxigenin (DIG)-UTPラベルのPrPLP/Dpl cRNAプローブを作製した。

(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。

C. 研究結果

1) Tg(NSE-PrPLP/Dpl)及びTg(PCP2-PrPLP/Dpl)マウスの確立

PrPLP/Dplを神経細胞特異的に発現させるために、PrPLP/Dpl cDNAをneuron specific enolase (NSE)遺伝子のプロモーターの下流に挿入したコンストラクトNSE-PrPLP/Dpl

と、PrPLP/Dplをプルキンエ細胞特異的に発現させるために、PrPLP/Dpl cDNAをPurkinje cell protein (PCP)-2遺伝子のプロモーターの下流に挿入したコンストラクトPCP2-PrPLP/Dplを作製した(図1)。これらのコンストラクトをC57BL/6マウスの受精卵に注入した結果、それぞれ9系統のトランスジェニック(Tg(NSE-PrPLP/Dpl)、Tg(PCP2-PrPLP/Dpl))マウスが得られた。9系統のTg(NSE-PrPLP/Dpl)マウスのうち、ウェスタンブロッティングにて脳内にPrPLP/Dplの発現を確認できたのは3系統(No. 25、31、32)であった。*in situ* hybridizationの結果、これらのマウスでは、プルキンエ細胞をはじめ全ての神経細胞にPrPLP/dpl mRNAの発現が認められた。一方、全てのTg(PCP2-PrPLP/Dpl)マウスでは、ウェスタンブロッティングにてPrPLP/Dplの発現を確認できなかった。しかし、6系統(No. 18、26、27、48、50、54)において、*in situ* hybridizationにてプルキンエ細胞特異的にPrPLP/Dpl mRNAの発現が確認できた。Tg(PCP2-PrPLP/Dpl)マウスではPrPLP/Dplがプルキンエ細胞のみに特異的に発現しているために、ウェスタンブロッティングでは検出できなかったと考えられる。

2) Tg(NSE-PrPLP/Dpl)Zrch I *Prnp*^{0/0}とTg(PCP2-PrPLP/Dpl)Zrch I *Prnp*^{0/0}マウスにおけるプルキンエ細胞変性死

Ngsk *Prnp*^{0/0}マウスに認められたプルキンエ細胞変性死とPrPLP/Dplの過剰発現との関係を明らかにするために、Tg(NSE-PrPLP/Dpl)No.25マウスとZrch I *Prnp*^{0/0}マウスを交配させ、Tg(NSE-PrPLP/Dpl)25Zrch I *Prnp*^{0/0}、Tg(NSE-PrPLP/Dpl)25Zrch I *Prnp*^{0/+}、及びTg(NSE-PrPLP/Dpl)25Zrch I *Prnp*^{+/+}マウスを作製した。その結果、Tg(NSE-PrPLP/Dpl)25Zrch I *Prnp*^{0/0}マウス(n=10)は339 \pm 31日で全て小脳失調性歩行を呈した(図2)。また、Tg(NSE-PrPLP/Dpl)25Zrch I *Prnp*^{0/+}マウス(n=31)も、435 \pm 131日から失調性歩行を呈しはじめた(図2)。しかし、Tg(NSE-PrPLP/Dpl)25Zrch I *Prnp*^{+/+}マウス(n=1)は、生後700日経過してもそのような症状を呈しなかった(図2)。また病理学的検索にて、失調性歩行を呈したTg(NSE-PrPLP/Dpl)25Zrch I *Prnp*^{0/0}とTg(NSE-PrPLP/Dpl)25Zrch

I *Prnp*^{0/+}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が、Tg(NSE-PrPLP/Dpl) 25Zrch I *Prnp*^{+/+}マウスではプルキンエ細胞は正常であった(図3)。これらの結果は、PrPLP/Dplの神経細胞における過剰発現は*Prnp*^{0/0}マウスにプルキンエ細胞変性死を惹起し、PrP^Cは発現量依存的にこの神経変性作用を阻害する機能を有することを示した。

次に、PrPLP/Dplによるプルキンエ細胞変性の分子機構をさらに解明するために、プルキンエ細胞のみに特異的にPrPLP/Dplを発現するTg(PCP2-PrPLP/Dpl)26マウスとZrch I *Prnp*^{0/0}マウスを交配させ、Tg(PCP2-PrPLP/Dpl) 26Zrch I *Prnp*^{0/0}、Tg(PCP2-PrPLP/Dpl) 26Zrch I *Prnp*^{0/+}、Tg(PCP2-PrPLP/Dpl) 26Zrch I *Prnp*^{+/+}マウスを作製した。その結果、Tg(PCP2-PrPLP/Dpl)26Zrch I *Prnp*^{0/0}マウス (n=5) とTg(PCP2-PrPLP/Dpl) 26Zrch I *Prnp*^{0/+}マウス (n=23) は、それぞれ277±14日と400±208日から失調性歩行をはじめ(図2)、病理学的検索にてプルキンエ細胞変性を呈した(図3)。しかし、Tg(PCP2-PrPLP/Dpl)26Zrch I *Prnp*^{+/+}マウスは、生後約560日経過しても、このような異常は認められなかった(図2)。これらの結果は、プルキンエ細胞に発現するPrPLP/Dplが神経細胞変性作用を発揮することを示した。

E. 結 論

プルキンエ細胞でのPrPLP/Dplの異所性発現は、プルキンエ細胞変性死を誘導し、PrP^CはPrPLP/Dplの神経変性作用を発現量依存性に阻害する。

F. 参考文献

- 1) Sakaguchi S., Katamine S., Nishida N., Moriuchi R., Shigematu 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., Shigematu K., Shirabe S., Petromilli C., Erpel S.P., Nakaoke R., Atarashi R., Houtani T., Torchia M., Sakaguchi S., DeArmond S.J., Prusiner S.B., Katamine S.: A mouse prion protein (PrP) transgene rescues Purkinje cell degeneration and demyelination in mice deficient for PrP. *Laboratory Investigation*. 79: 689-697, 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) 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
- 5) 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

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

西田教行、片峰茂：プリオン病の分子機序「特集・ニューバリエントクロイツフェルトーヤコブ病」化学療法の領域 18巻5号、19-25、2002

片峰茂：プリオン類似分子—Doppel— 121回日本医学会シンポジウム「プリオン病」記録集、日本医学会、pp65-70、2002

2. 学会発表

Katamine S: Biological divergence among prion strains in cell culture models. In The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Island, August 24-27, 2002

片峰茂：プリオン蛋白欠損マウスにおける神経変性分子機構とプリオン類似蛋白、シンポジウム「プリオン病の最前線」、第133回日本獣医学会学術集会、専修大学（神奈川）、2002年3月29日

片峰茂：プリオン類似分子—Doppel—、第121回日本医学会シンポジウム「プリオン病」、箱根、2002年8月31日

片峰茂：プリオン蛋白とプリオン病の分子機構（特別講演）、第55回日本寄生虫学会南日本支部大会／第52回日本衛生動物学会南日本支部大会、長崎大学医学部、2002年10月26日

山口尚宏、坂口末廣、重松和人、西田教行、新竜一郎、有馬和彦、片峰茂：プリオン淡白遺伝子ノックアウトによるPurkinje細胞変性死の分子機構、ワークショップ「遺伝子変異動物を用いた行動制御遺伝子の解析：遺伝子変異と行動異常」、第25回日本分子生物学会年会、横浜市、2002年12月12日

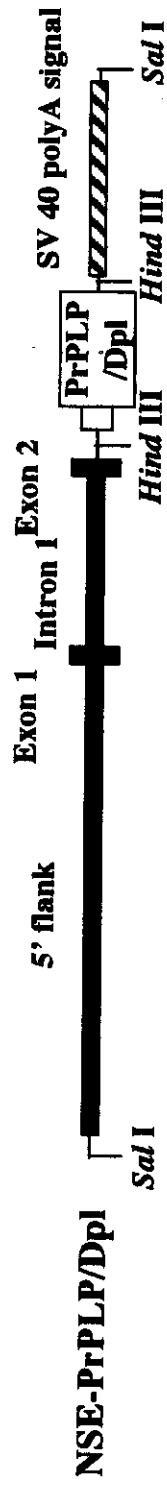
渡辺健、西田教行、小林信之、坂口末廣、片峰茂：PrPのpost-translational modification、第50回日本ウイルス学会学術集会・総会、札幌市、2002年10月18日

有馬和彦、西田教行、山口尚宏、新竜一浪、坂口末廣、重松和人、片峰茂：プリオン淡白の高次構造とプリオン株の生物学的性質、第50回日本ウイルス学会学術集会・総会、札幌市、2002年10月18日

I. 知的所有権の出願・登録状況

なし

Neuron specific enolase (NSE)



Purkinje cell protein (PCP)-2



図1：トランスジェニック(Tg)マウス作製に用いたコンストラクト。
 Neuron specific enolase (NSE)のプロモーターの下流にPrPLP/Dpl cDNAを挿入したNSE-PrPLP/Dplと
 Purkinje cell protein-2 (PCP2)のプロモーターの下流にPrPLP/Dpl cDNAを挿入したPCP2-PrPLP/Dpl。

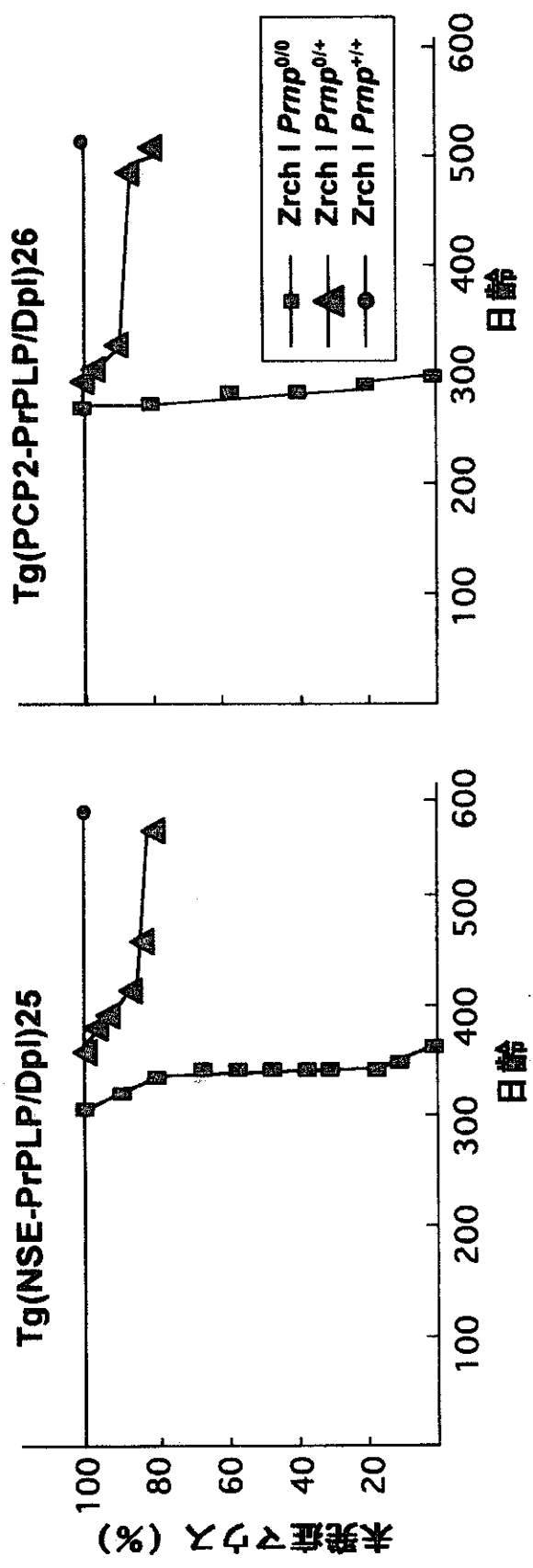


図 2 : Tg(NSE-PrPLP/Dpl)25とTg(PCP2-PrPLP/Dpl)26マウスにおけると失調性歩行とPrPの抑制効果。

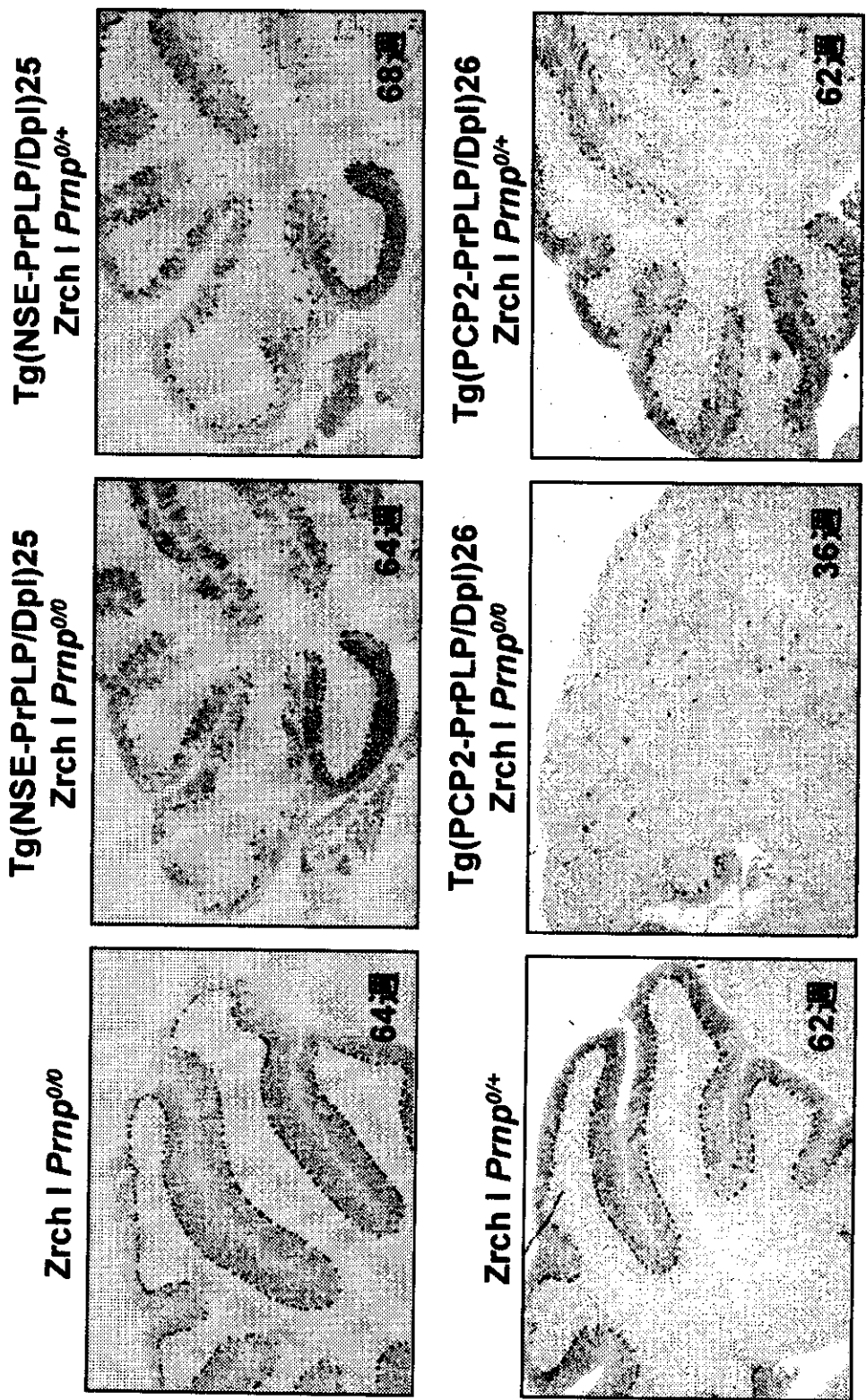


図3 : Tg(NSE-PrPLP/Dpl)25とTg(PCP2-PrPLP/Dpl)26マウスにおけるプルキンエ細胞変性死とPrPの抑制効果。
 Tg(NSE-PrPLP/Dpl)25とTg(PCP2-PrPLP/Dpl)26マウスにおけるプルキンエ細胞変性死は、PrPの遺伝子量に比例して抑制される。

特発性プリオン病の疾患感受性因子および プリオン蛋白相互作用因子に関する研究

分担研究者 堂 浦 克 美 九州大学大学院医学研究院 助教授
研究協力者 佐々木 健 介、西 村 有 起、岩 城 徹
九州大学大学院医学研究院

研究要旨

特発性プリオン病の感受性因子の候補として、プリオン病動物実験で伝播・発症との関連が報告されている補体蛋白C1qやC3のレセプター(C1qBP, C1qRP, CR1, CR2)と、補体系抑制因子であるclusterinに注目した。19例の特発性ヤコブ病患者と51例の対照者において、これらの遺伝子をPCR、DNAシーケンシング、RFLP法で解析して遺伝子多型と疾患との関連を検討した。これまでに検索した中では、C1qRp遺伝子において疾患群と対照群とで有意に異なる遺伝子多型を認めしたが、CR1およびC1qBPに確認された多型については、保有率に有意差を認めなかった。一方、プリオン蛋白と相互作用する感染関連因子を探索するため、マウス組換え体プリオン蛋白(121-231)をリガンドとし、プリオン感染細胞と非感染細胞のラフト画分と反応させたところ、両群間で異なる2種の蛋白質の存在を明らかにした。

A. 研究目的

本邦では年間110例前後のプリオン病の発生が見られるが、そのおよそ9割が特発性(散発性)クロイツフェルト・ヤコブ病である。特発性に発生する外的要因については不明であり、宿主側要因として疾患感受性因子の存在が動物プリオン病の研究より明らかとなっている。本研究は疾患感受性因子保有者の罹患予防や罹患時の早期診断・早期治療ができる基盤を整備するため、疾患感受性因子の探索を行う。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おり(1)、補体蛋白の発現を抑制、あるいは補体レセプターであるCR1をノック・アウトしたマウスでは、プリオン病感染因子の腹腔内投与による伝播・発症が抑制されることが報告されている(2,3)。これまでに我々は、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、CR1、C1qBPの遺伝子多型を確認した。そこで、症例数を増やして正常対照群との比較による統計学的検討を行った。また、補体レセプターであるC1qRpとCR2、および補体系活

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(4)についても同様に解析した。

一方、プリオン病の伝播、発症には種々のタンパク質が関与していることが報告されているが、プリオン病の感染因子とされている異常型プリオン蛋白の産生メカニズムは不明である。正常型から異常型への変換反応には反応をスムーズに進めるための何らかの因子が存在しているとされている。その産生メカニズムを解明することはクロイツフェルト・ヤコブ病の治療や予防にもつながると考えられる。そこで異常型プリオン蛋白産生に関わる因子の探索を行う事を目的とし、マウス組換え体プリオン蛋白(121-231)をリガンドとした結合タンパク質の検索を行った。

B. 研究方法

(i) 特発性プリオン病の疾患感受性因子の検討

試料：九州大学脳研病理教室において剖検された特発性クロイツフェルト・ヤコブ病症例の凍結脳または一般臓器から抽出したDNA、およびプリオン病が疑われ、プリオン蛋白遺