

図1. アルカリフォスファターゼ(AP)用化学発光基質とペルオキシダーゼ(HRP)発光基質のrBoPrP検出感度の比較。

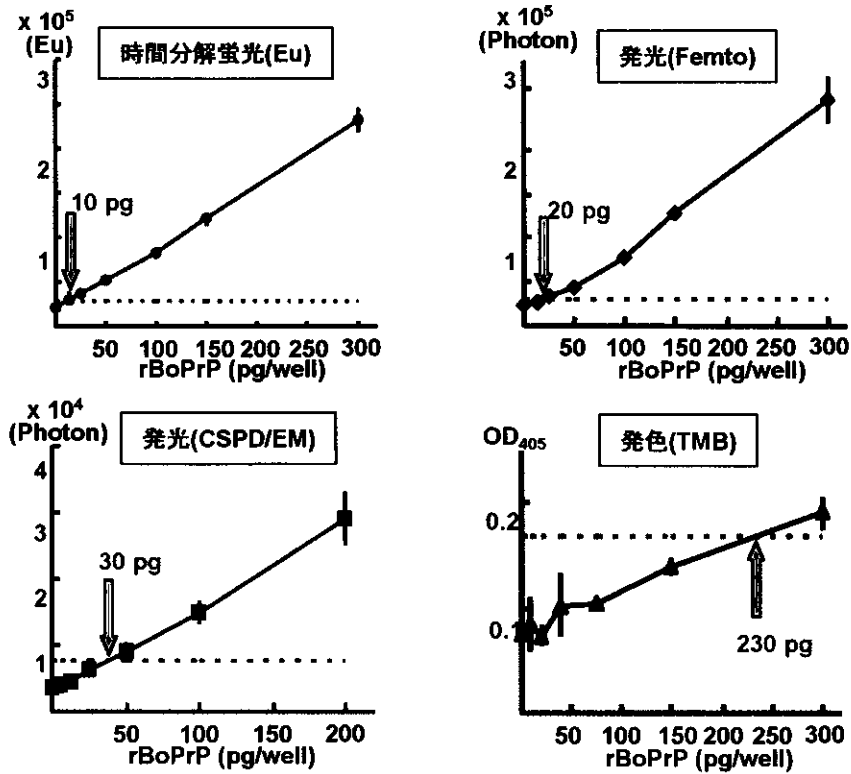


図2. 時間分解蛍光測定法、化学発光法(Supersignal femtoおよびCSPD/EM)、および発色法(TMB)のrBoPrPの検出限界。各方法におけるCut off値を点線で、また検出限界を矢印で示した。

プリオン蛋白欠損マウスに認められたプルキンエ細胞変性死の分子機構

班 員：坂口 末廣（長崎大学・大学院医歯薬・感染分子病態）
研究協力者：山口 尚宏（長崎大学・大学院医歯薬・感染分子病態）
片峰 茂（長崎大学・大学院医歯薬・病態解析・制御学）
重松 和人（長崎大学・大学院医歯薬・感染分子病態）

[研究要旨]

プリオン蛋白欠損 (*Prnp*^{0/0}) マウスに認められた小脳プルキンエ細胞変性死には、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していると考えられている。そこで我々はこのことを明らかにするために、PrP^C の機能は消失しているが PrPLP/Dpl を発現しない *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 (Tg(PrPLP/Dpl)) 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。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。

The molecular mechanism of Purkinje cell degeneration in the mice devoid of prion protein

Suehiro SAKAGUCHI¹⁾, Naohiro YAMAGUCHI¹⁾, Shigeru KATAMINE¹⁾, Kazuto SHIGEMATSU²⁾

Department of Molecular Microbiology and Immunology, Department of Translational Medical Sciences,
Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

ABSTRACT

We and others previously demonstrated that prion protein-like protein (PrPLP/Dpl) is ectopically overexpressed in the brains of the PrP-deficient (*Prnp*^{0/0}) mice exhibiting Purkinje cell degeneration, including *Ngsk Prnp*^{0/0} mice, but not in the *Prnp*^{0/0} mice showing no such degeneration, including *Zrch I Prnp*^{0/0} mice. This result strongly suggests that both the functional loss of PrP and the ectopic overexpression of PrPLP/Dpl could be causally associated with the Purkinje cell degeneration. To elucidate the involvement of PrPLP/Dpl in the neuronal

degeneration, we established transgenic mice, designated Tg(PrPLP/Dpl)Zrch I *Prnp*^{0/0} mice, which express PrPLP/Dpl ectopically in either neurons or Purkinje cells against the genetic background of Zrch I *Prnp*^{0/0} mice. All Tg(PrPLP/Dpl)Zrch I *Prnp*^{0/0} mice became ataxic and exhibited Purkinje cell degeneration. Moreover, Tg(PrPLP/Dpl)Zrch I *Prnp*^{0/+} mice also developed the same symptom and degeneration after a much longer period. However, Tg(PrPLP/Dpl)Zrch I *Prnp*^{+/+} mice have never shown the Purkinje cell degeneration. These results clearly showed that the ectopic expression of PrPLP/Dpl is involved in the Purkinje cell degeneration, and that PrP prevents the PrPLP/Dpl-induced neuronal degeneration in a dose-dependent manner.

[はじめに]

我々が作成したプリオン蛋白欠損 (N_{gsk} *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 N_{gsk} *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。

[材料と方法]

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(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*^{+/+}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]/1mMEDTA/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 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-in-dolyl phosphate)を用いた enzyme-linked immunosorbent assay にて検出した。

3) プロープの作製

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

(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。

[結果と考察]

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*⁰⁰ と Tg(PCP2-PrPLP/Dpl)Zrch I *Prnp*⁰⁰ 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)25*Zrch I Prnp*^{0/0}、Tg(NSE-PrPLP/Dpl)25*Zrch I Prnp*^{0/+}、及び Tg(NSE-PrPLP/Dpl)25*Zrch I Prnp*^{+/+} マウスを作製した。その結果、Tg(NSE-PrPLP/Dpl)25*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 (図 2)。また、Tg(NSE-PrPLP/Dpl)25*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 (図 2)。しかし、Tg(NSE-PrPLP/Dpl)25*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 (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)25*Zrch I Prnp*^{0/0} と Tg(NSE-PrPLP/Dpl)25*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)25*Zrch 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)26*Zrch I Prnp*^{0/0}、Tg(PCP2-PrPLP/Dpl)26*Zrch I Prnp*^{0/+}、Tg(PCP2-PrPLP/Dpl)26*Zrch I Prnp*^{+/+} マウスを作製した。その結果、Tg(PCP2-PrPLP/Dpl)26*Zrch I Prnp*^{0/0} マウス (n=5) と Tg(PCP2-PrPLP/Dpl)26*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 (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)26*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 (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。

[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。

[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., Nakaoko 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., Nakaoka R., Arima K., Okimura, N., Kopacek, J., and Shigematsu, K.: Identification of a novel gene encoding a PrP-like protein expressed as chimeric transcripts fused to PrP exon 1/2 in ataxic mouse line with a disrupted PrP gene. *Cell. Mol. Neurobiol.* 20: 553-567, 2000

[研究発表]

1.論文発表

なし

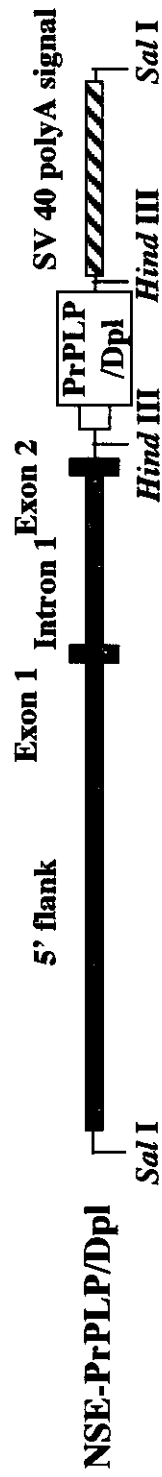
2.学会発表

- 1) Sakaguchi S., Atarashi R., Shigematsu K., Katamine S.: Evaluation of pathogenic roles of PrPLP/Dpl in prion diseases. International Symposium on The New Prion Biology: Basic Science, Diagnosis and Therapy, Venezia, Italy, 2002
- 2) Arima K., Nishida N., Sakaguchi S., Lehmann S., Katamine S.: The strain diversity of the TSE agent in cell-culture models. International Conference on Transmissible Spongiform Encephalopathies, Edinburgh, UK, 2002
- 3) 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：プリオン蛋白遺伝子ノックアウトによる Purkinje 細胞変性死の分子機構。第 25 回日本分子生物学学会ワークショップ「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」
- 4) 坂口末廣：プリオン蛋白の病態生化学。第 1 回生物試料分析科学会関東支部学術集会、東京、2002
- 5) 坂口末廣：プリオン蛋白の分子生物学。第 7 回動物細胞工学シンポジウム「プリオン研究の最前線」、東京、2002
- 6) 坂口末廣：プリオン蛋白とプリオン病。老化脳ミニシンポジウム「ストレス・疲労・神経損傷から老化脳保護への分子戦略」、長崎、2002
- 7) 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、札幌、2002
- 8) 有馬和彦、西田教行、山口尚宏、新竜一郎、坂口末廣、重松和人、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。第 50 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2002

[知的所有権と取得状況]

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。

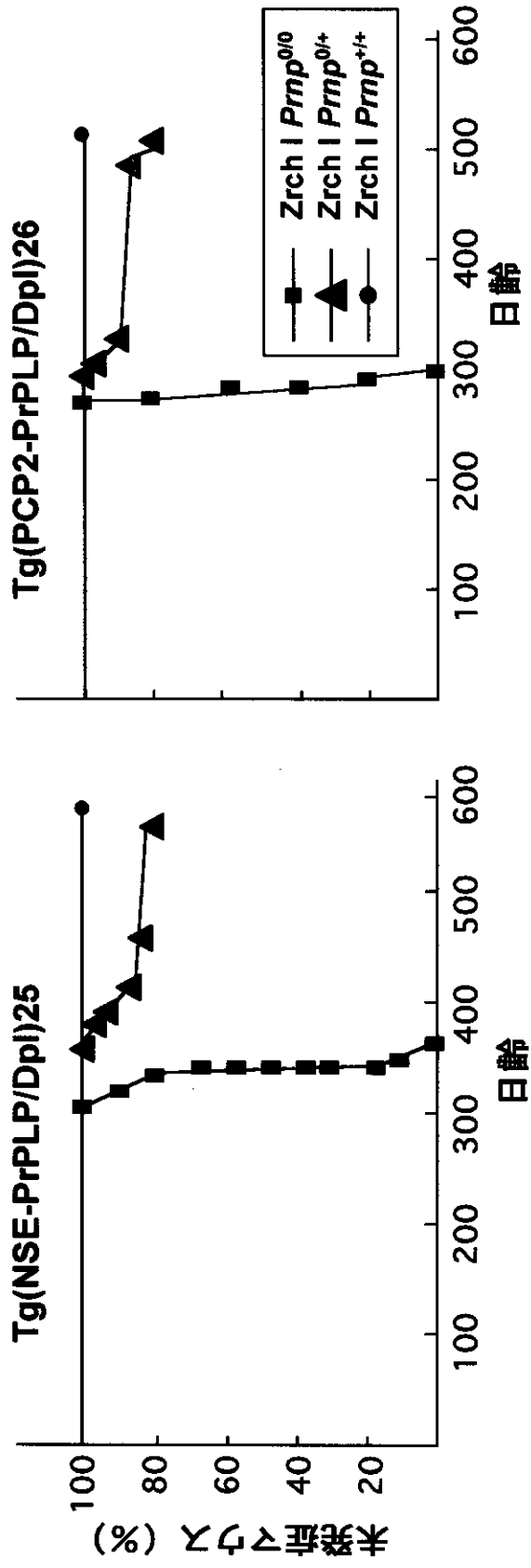


図 2 : Tg(NSE-PrPLP/Dpl)25とTg(PCP2-PrPLP/Dpl)26マウスにおけると失調性歩行とPrPの抑制効果。

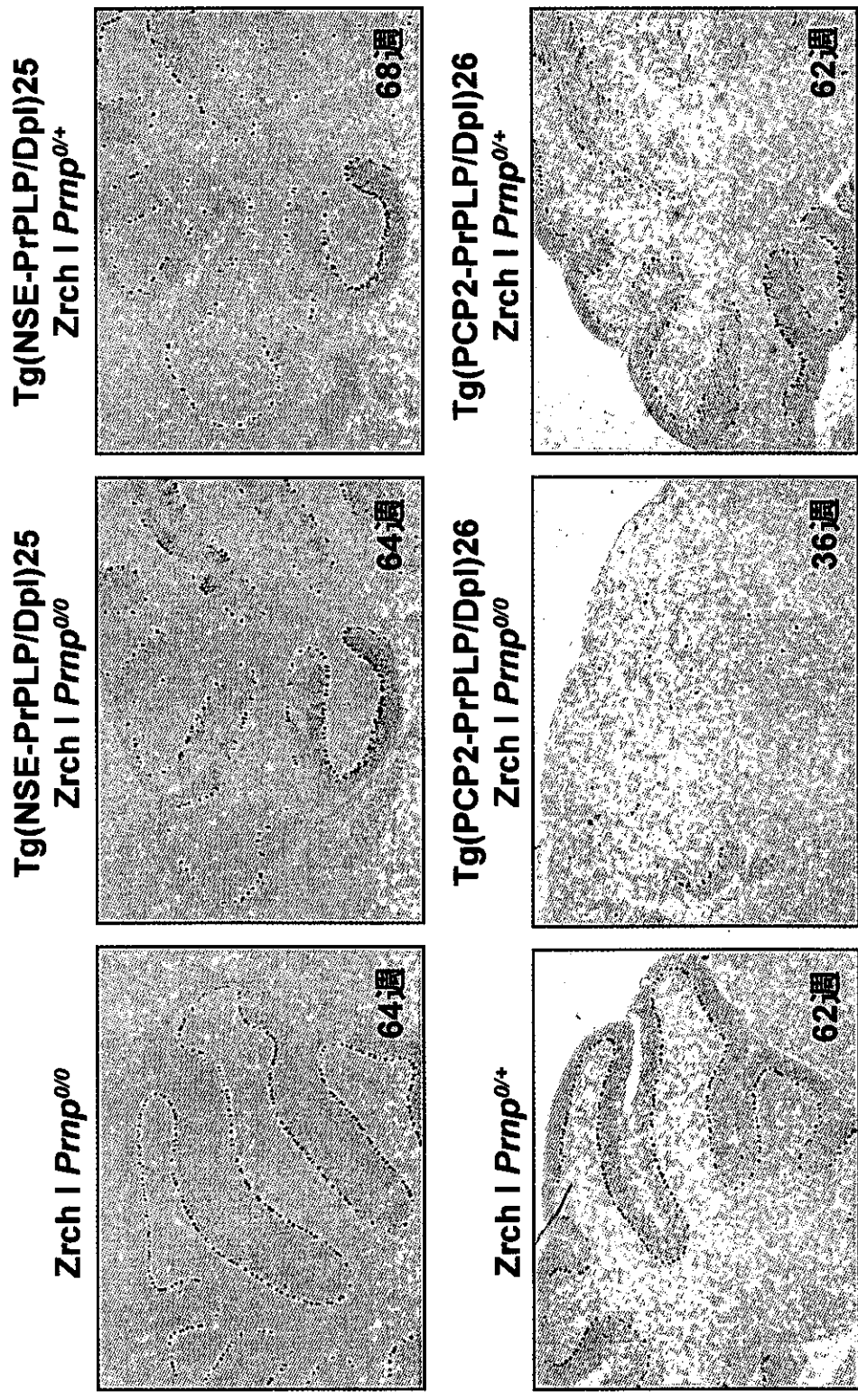


図3 : Tg(NSE-PrPLP/Dpl)25とTg(PCP2-PrPLP/Dpl)26マウスにおけるプルキンエ細胞変性死とPrPの抑制効果。Tg(NSE-PrPLP/Dpl)25とTg(PCP2-PrPLP/Dpl)26マウスにおけるプルキンエ細胞変性死は、PrPの遺伝子量に比例して抑制される。

正常プリオン蛋白質の機能と酸化ストレスに関する研究

班 員：佐伯 圭一（東京大学・大学院農・応用免疫）

【研究要旨】

正常型プリオン蛋白質(PrP^C)の機能は十分に明らかにされていない。本研究では PrP^C の機能解析を目的として、プリオン蛋白質 (PrP) 遺伝子ノックアウトマウス海馬由来不活化神経細胞株を樹立し、PrP 再発現前後における細胞の機能的変化について解析を行なった。PrP 欠損神経細胞株は、無血清培地においてアポトーシスを起こすが、PrP の再発現化によりアポトーシスが抑制されることを以前に報告した。しかしながら、PrP^C がどのような機構で細胞死を抑制し回避するのか分かっていない。そこで本年度は PrP 欠損神経細胞株および PrP 再発現神経細胞株を解析することにより、PrP^C の機能および PrP^C 欠損時の神経細胞死発現機構の解析を行うことを目的とした。PrP 再発現に伴い、Superoxide dismutase(SOD)活性が上昇し、血清除去時に見られる活性酸素の発生の抑制および過酸化水素の蓄積が観察された。PrP は銅と結合することが報告されており、銅代謝を制御することにより SOD 活性を制御し、活性酸素の除去に関わっていることが考えられる。

Study on the relationship between function of cellular prion protein and oxidative stress

Keiichi Saeki

Department of Molecular Immunology, School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo

ABSTRACT

The author previously demonstrated the relation between cellular prion protein (PrP^C) and apoptosis using immortalized prion protein (PrP) gene (*Prnp*)-deficient neuronal cells. However, the mechanism(s) by which PrP^C prevents apoptosis remains unclear. In this study, to understand neuroprotective property of PrP^C, the author analyzed apoptosis of *Prnp*^{-/-} cells. Re-introduction of *Prnp* upregulated SOD activity and eliminated superoxide anion generation and enhanced hydrogen peroxide accumulation under the serum-free condition. As PrP^C was bound to copper in the octapeptide repeats, these results suggested that PrP^C inhibited apoptosis by regulation of SOD activity due to copper metabolism regulation.

【はじめに】

本研究グループは世界で数系統しか存在しない加齢による行動異常を伴うプリオン蛋白質(PrP)遺伝子欠損マウス(RiKn マウス)を維持している。このマウスを用いた研究では PrP 遺伝子欠損マウス脳海馬より不活化神経細胞株を樹立し、この樹立株のアポトーシス性状について Nature に一報を公表した(1)。しかしながら、これらのマウスや神経細胞株の特徴であるアポトーシスに至るまでの機構については十分な研究がされていない。そこで、本研究ではプリオン蛋白質発現に伴うアポトーシスの出現や抑制効果、さらに抗酸化作用について研究を進め PrP の機能を明らかにしていく。

【目 的】

PrP 欠損神経細胞株は、無血清培地においてアポトーシスを起こすが、PrP の再発現化によりアポトーシスが抑制されることを以前に報告した。しかしながら、PrP^C がどのような機構で細胞死を抑制し回避するのか分かっていない。そこで本年度は PrP 欠損神経細胞株および PrP 再発現神経細胞株を解析することにより、PrP^C の機能および PrP^C 欠損時の神経細胞死発現機構の解析を行うことを目的とした。

【材料と方法】

マウス PrP 欠損神経細胞株 (HpL3-4) および PrP 再導入株 HpL3-4PrPNo3 および HpL3-4PrPNo7 は 10% ウシ胎児血清を含んだダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (Sigma) を用いて、37°C、5% CO₂ インキュベーターで培養した。血清除去は、無血清 DMEM に 4 回置換することにより行った。SOD 活性測定は SOD アッセイキット-WST(Dojindo) を用い、Cu/Zn SOD 標準液(Sigma S2515)より活性値を求めた。活性酸素および過酸化水素量はフリーラジカル特異的蛍光プローブを用い、フローサイトメトリー解析により測定した。活性酸素特異的蛍光プローブとして dihydroethidium (DH) (Molecular Probes) を用い、過酸化水素特異的蛍光プローブとして 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Lambda Probes) を用いた。

【倫理面への配慮】

実験動物取り扱いおよび遺伝子組換えを含む研究は、文部科学省指針および東京大学規定に従い所定の書類を提出し承認を得て行った。

【結 果】

キサントン/キサントンオキシダーゼ系を用いた吸光度法により SOD 活性を測定した結果、PrP 再発現細胞は PrP 欠損細胞と比較して、有意に SOD 活性が高かった (図 1)。次に、フリーラジカル特異的蛍光プローブを用いたフローサイトメトリー解析により、活性酸素および過酸化水素量を調べた。SOD は $2O_2 \cdot + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ の反応を触媒する酵素である。DH により細胞内活性酸素を測定し、DCFH-DA により細胞内過酸化水素を測定した。PrP 欠損細胞で見られる血清除去時の細胞内活性酸素の発生が PrP 再発現細胞では抑制されていた(図 2)。一方、PrP 再発現細胞において PrP 欠損細胞と比較して、細胞内過酸化水素の蓄積が観察された(図 2)。

【考 察】

PrP 再発現に伴い細胞内の活性酸素が消去され、過酸化水素が蓄積していたことから PrP が SOD 活性を調節しているかまたは PrP 自身が SOD 様の酵素活性を持っていることが示唆された。PrP は銅と結合することが報告されており、銅代謝を制御することにより SOD 活性を制御し、活性酸素の消去に関わっていることが考えられる。マウスがプリオンに感染すると、PrP^o が PrP^{Sc} に変化し、PrP^{Sc} は神経細胞に蓄積する。PrP^o が PrP^{Sc} に変換する事により、細胞内 PrP^o 量は減少することが報告されている(2)。本研究により、PrP^o が欠損するとその結果として SOD 活性が低下し、酸化ストレス誘導時には活性酸素量が上昇して神経細胞死が発現される可能性が明らかとなった。これらの結果は、PrP^{Sc} の増量のみならず、PrP^o の減量も神経細胞死発現に重要な役割を担う事を示唆している (Sakudo, A et al., J. Biol. Chem. 投稿中)。

【結 論】

PrP^C の生理機能の 1 つとして、PrP^C は直接もしくは間接的に細胞内の抗酸化ストレスを高めることにより、神経細胞生存維持に関わっていることが示唆される。

【参考文献】

- 1) Kuwahara C, Takeuchi AM, Nishimura T, Haraguchi K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Saeki K, Matsumoto Y, Yokoyama T, Itohara S, Onodera T : Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature*. 400 : 225-226,1999
- 2) Yokoyama T, Kimura KM, Ushiki Y, Yamada S, Morooka A, Nakashiba T, Sassa T, Itohara S : *In vivo* conversion of cellular prion protein to pathogenic isoforms, as monitored by conformation-specific antibodies. *J. Biol. Chem.* 276 : 11265-11271,2001

【研究発表】

1.論文発表

- 1) Shyu WC, Harn HJ, Saeki K, Kubosaki,A, Matsumoto Y, Onodera T, Chen CJ, Hsu YD, Chiang YH : Molecular modulation of expression of prion protein by heat shock. *Mol. Neurobiol.* 26 : 1-12,2002

2.学会発表

- 1) 佐伯圭一 : プリオンの分子生物学. 第 13 回日本生体防御学会学術集会シンポジウム,2002
- 2) 佐伯圭一 : プリオンの分子生物学. 第 6 回日本神経ウイルス研究会研究集会基調公演,2002
- 3) 佐伯圭一 : プリオン蛋白質の機能と免疫学. 第 14 回獣医免疫研究会シンポジウム,2002
- 4) 佐伯圭一 : 動物の検疫および水際対策. 日本水産学会水産環境保全委員会研究会,2002
- 5) Sakudo A, Lee DC, Matsumoto Y, Itohara S, Onodera T, Saeki K. ACTIVATION OF SUPEROXIDE DISMUTASE INDUCED BY PRION PROTEIN GENE TRANSFECTION, 2nd The Awaji International Forum on Infection and Immunity,2002
- 6) Sakudo A, Lee DC, Saeki K, Matsumoto Y, Itohara S, Onodera T. ANTIOXIDANT ACTIVATION INDUCED BY PRION PROTEIN GENE TRANSFECTION PREVENTS APOPTOSIS. XIIIth International Congress of Virology,2002
- 7) Nishimura T, Saeki K, Ogawa Y, Matsumoto Y, Onodera T. COPPER STIMULATES CASPASES ACTIVATION AND APOPTOTIC CELL DEATH IN PRIMARY CULTURE OF PRION PROTEIN-DEFICIENT CEREBELLAR GRANULE NEURONS. XIIIth International Congress of Virology, 2002
- 8) Sakudo A, Lee DC, Saeki K, Nakamura Y, Matsumoto Y, Itohara S, Onodera T. Gene transfer analysis of apoptosis in prion protein-deficient neuronal cells, International Symposium on THE NEW PRION BIOLOGY: BASIC SCIENCE, DIAGNOSIS AND THERAPY,2002
- 9) 作道章一, 李得燦, 佐伯圭一, 井上敬一, 松本芳嗣, 糸原重美, 小野寺節. アポトーシス関連遺伝子の導入による不死化プリオンレス神経細胞死の解析. 第 157 回日仏生物学会,2002
- 10) 作道章一, 李得燦, 佐伯圭一, 糸原重美, 松本芳嗣, 小野寺節. アポトーシス抑制因子 Bcl-2 family, Superoxide dismutase (SOD)遺伝子およびプリオン遺伝子の導入による不死化プリオンレス神経細胞死の解析. 133 回日本獣医学会学術集会,2002
- 11) 作道章一, 李得燦, 佐伯圭一, 井上敬一, 松本芳嗣, 糸原重美, 小野寺節. 不死化プリオンレス神経細胞株を用いた正常型プリオン蛋白質の機能解析. 生体防御学会懇親セミナー,2002
- 12) 作道章一, 李得燦, 佐伯圭一, 糸原重美, 松本芳嗣, 小野寺節. プリオン遺伝子欠損神経細胞株における血清除去誘導細胞死の解析. 第 6 回日本神経ウイルス研究会研究集会,2002
- 13) 西村拓也, 李得燦, 作道章一, 佐伯圭一, 松本芳嗣, 小野寺節. R1kn 型 Prnp 0/0 マウス由来小脳神経細胞の銅、マンガン感受性について. 第 6 回日本神経ウイルス研究会集会,2002
- 14) 徐聖旭, 神山垣夫, 佐多徹太郎, 松田潤一郎, 山田章雄, 桑原正貴, 局博一, 遠藤秀紀, 糸原重美, 佐伯圭一, 松本芳嗣, 小野寺節. シロオリックス PrP 遺伝子を有する Tg マウスにおけるプリオン高感受性及び過発現による心臓異常. 第 6 回日本神経ウイルス研究会集会,2002

[知的所有権の取得状況]

図 1. PrP 欠損神経細胞(HpL3-4)および PrP 再発現細胞株(HpL3-4PrPNo3, HpL3-4PrPNo7)の SOD 活性

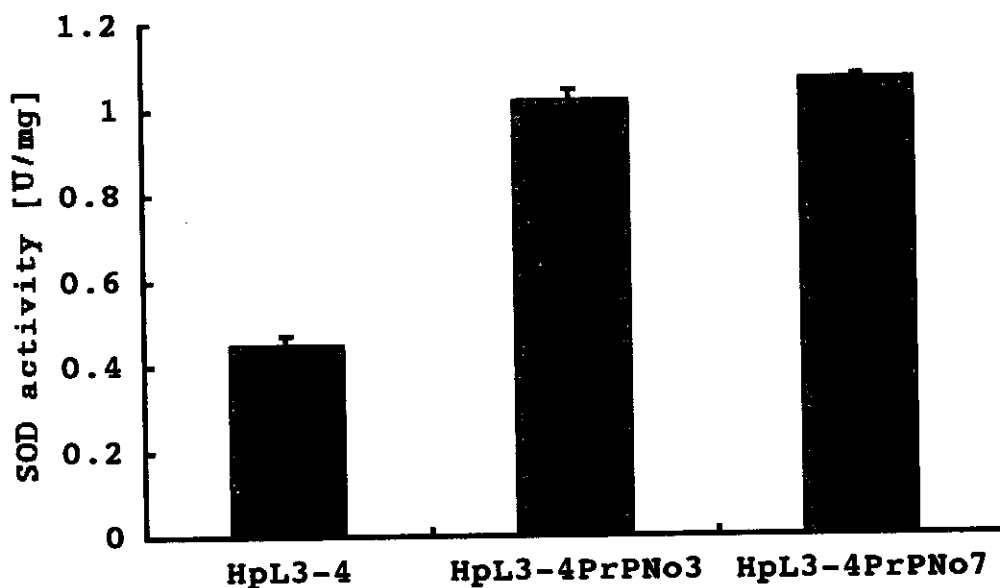


図 2. PrP 欠損神経細胞および PrP 再発現細胞株の細胞内活性酸素および過酸化水素量

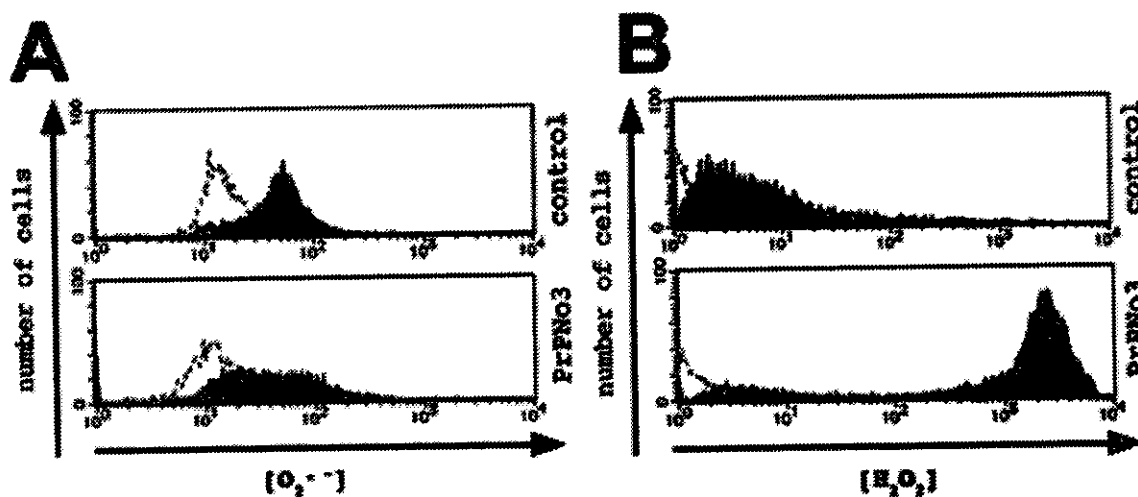


図 2 血清除去 0 時間(白色の領域)および 6 時間後(黒色の領域)において PrP 再発現細胞株 HpL3-4PrPNo3 (PrPNo3) と PrP 欠損神経細胞株 HpL3-4 (control) の細胞内活性酸素($O_2^{\cdot -}$)量(A)および細胞内過酸化水素(H_2O_2)量(B)を特異的蛍光試薬を用いてフローサイトメトリーにより測定した。血清除去によって PrP 欠損神経細胞および PrP 再発現細胞における細胞内活性酸素と過酸化水素の増加が認められた。しかしながら、PrP 欠損神経細胞と比較して PrP 再発現細胞は、細胞内活性酸素の低下と細胞内過酸化水素の蓄積が観察された。

正常プリオン蛋白質の分解酵素同定に関する研究

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：逆瀬川裕二、八谷 如美（同・疾病研究第七部）

〔研究要旨〕

正常型プリオン蛋白質の生理的切断部位は、感染型プリオン蛋白質立体構造の鍵となる．シート領域と重なり、しかも極めて疎水性の高い部分に位置するため、正常プリオン蛋白質分解酵素がアクセスする際及び感染型プリオン蛋白質への変換の際に、何らかの分子シャペロン様分子の関与が示唆される。

さらに、この分子は通常分子シャペロンとは異なり、*misfolding*された分子ではなく正常に *folded*された分子を認識するという概念が大きく異なる。我々は、正常に *folded*された分子を認識し、それを *unfold*する活性を検出する系を、出芽酵母を用いて確立した結果、新しい概念に属するシャペロン様分子を同定し、“Unfoldin”と命名した。次年度は、同様のアッセイ系を用い哺乳動物細胞を解析した結果同定し得た、組み換え PrP を *unfolding*する活性の本体を解明していく。

The unfolding and proteolysis of a cellular prion protein in its metabolic pathway

Kiyotoshi KANEKO, Yuji SAKASEGAWA, 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 isolated an ATP-dependent protein unfolding factor designated as Unfoldin from *S. cerevisiae*. ATP, but not its hydrolysis, promoted binding of Unfoldin to protein substrates and their conformation changes with broad specificity *in vitro*. Gel filtration and low angle shadowing electron microscopy revealed that Unfoldin formed a homo-oligomeric complex consisting of 10~12 subunits arranged in an oval-ring or wrench-shaped structure with a ~2 nm central cavity. Unfoldin was localized to the cell periphery at the stationary phase, whereas at the log phase it was localized on the budding sites and then surrounded the bud neck during cell division. The most significant unfolding activity of Unfoldin was detected at the log phase, indicating that *in vivo* unfolding activity of Unfoldin was cell cycle dependent. Unfoldin is an ATP-dependent protein unfolding chaperone which targets correctly folded substrates with broad specificity *in vitro*, and functions with the septin complex and F-actin in the budding process and/or cell division *in vivo* through its unfolding activity in a cell cycle-dependent manner, which might be intrinsic to these processes.

〔はじめに〕

正常型プリオン蛋白質 (PrP^C) は、異常感染型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) を鋳型とした PrP^C から PrP^{Sc} への高次構造変換がその基盤にあると考えられている。生体内における PrP^C の分解経路において、PrP^C はその中心領域で最初の分解を受けることが知られている。この部分は、PrP^{Sc} への変換に際しても *critical* な領域、いわゆる、 β -シート領域に相当するため、分解を受けるかあるいは変換されるか、互いに相補的な関係を有する。言い換えれば、この部分で切断されてしまえばもはや PrP^{Sc} への変換は生じ得ないため、治療法開発の点からも重要である。また同時に、この部分は非常に疎水性に富んでいるため、分解酵素がアクセス

する際にはこの領域が **unfold** される必要があると推察される。我々は、まずこの部分を **unfold** する分子の同定を目指している。これは、PrP^{Sc} への変換に関与する分子シャペロン様分子、いわゆる X 因子との相同性も注目される。

しかしながら、これらの **unfolding** 活性は正常に **folded** された分子 (PrP^C) を標的とすると考えられるため、従来から知られている **misfolding** された蛋白質を標的とする一般的な分子シャペロンの範疇には該当しない。そこで我々は、このような正常分子に対し **unfolding** 活性を発揮する新規分子シャペロンが実際に存在するかどうかを、まず yeast の系において検討した。

〔目的〕

PrP^C の代謝機構並びに PrP^{Sc} への変換機構の解明に向けて、正常型プリオン蛋白質と相互作用する分解酵素や **unfolding factor** といった新規分子群を同定し作用機序を検討する。

〔材料と方法〕

PrP^C を **unfold** する活性を検出するための検出系を *S. cerevisiae* を用いて確立した。この、いわゆる **unfolding assay** 系の概要として、まず **prepro α -factor (pp α F)** を基質として用い、**refolding** を受けた pp α F は分解されないが、**unfolding** された pp α F のみが **trypsin** によって分解される条件を確立した。ここに、yeast の **microsome fraction** を加えることでの pp α F の分解が生じることを確認した。Yeast **microsome fraction** 中には、pp α F の **unfolding activity** が存在すると考えられたため、この活性を同定するため Table 1 のステップにより、最終的にこの活性を同定した。

Table 1 Purification of unfoldin from yeast microsomes salt extracts

Purification step	Total protein(mg)	Total activity(units)	Specific activity(units/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
NaCl Extract	200	2200	11	1	100
DEAE- FastFlow	20	1066	53	5	49
ResourceQ	3	1000	333	30	45
Hydroxy A patite	0.15	350	2333	212	16
ATPagarose	0.03	222	6938	631	10

(倫理面への配慮)

〔結果〕

正常に **folded** を受けた蛋白質を標的とする **Unfolding** 活性の検出系を Yeast において確立した。その結果、正常に **folded** された蛋白質を **unfold** する新規クラスの分子シャペロンを同定し、“**Unfoldin**”と命名した。

〔考察〕

Unfoldin は通常の分子シャペロンとは異なり、**misfold** された分子ではなく正常に **folded** された分子を認識する。プリオン蛋白質に関連する X 因子も、この範疇に入る分子シャペロンであると考えられる。また我々は、**Unfoldin** は cell cycle 依存性にその **unfolding** 活性を変化させることを見出した。このことは、分子シャペロンは **misfolding** された分子を認識するのみならず、正常分子の“**unfolding**”を通じて正常蛋白質の代謝制御に関与するという、従来知られていない新しい生体内分子制御機構の概念に通ずる。

〔結論〕

Yeast の **unfolding** アッセイ系を用い、正常に **folded** された蛋白質を標的として **unfolding** するという、従来の概念とは異なる新しいクラスの分子シャペロン、“**Unfoldin**”を同定した。現在、組み換え PrP を基質として哺乳動物細胞の検討を行った結果、同様の活性を同定しその詳細を検討中である。

〔参考文献〕

- 1) Taraboulos A, Raeber AJ, Borchelt DR, Serban D, Prusiner SB: Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells. *Mol. Biol. Cell.* 3: 851-863,1992
- 2) Harris DA, Huber MT, van Dijken P, Shyng S-L, Chait BT, Wang R: Processing of a cellular prion protein: identification of N- and C-terminal cleavage sites. *Biochemistry.* 32: 1009-1016,1993
- 3) Huang Z, Gabriel J-M, Baldwin MA, Fletterick RJ, Prusiner SB, Cohen FE: Proposed three-dimensional structure for the cellular prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 7139-7143,1994
- 4) Telling GC, Scott M, Mastrianni J, Gabizon R, Torchia M, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB: Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell.* 83: 79-90,1995
- 5) Kaneko K, Zulianello L, Scott M, Cooper CM, Wallace AC, James TL, Cohen FE, Prusiner SB: Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 10069-10074,1997

〔研究発表〕

1. 論文発表

- 1) Furuta M, Ito T, Eguchi C, Tanaka T, Wakabayashi-Takai E, Kaneko K: Two-dimensional electrophoresis/phage panning (2D-PP); A novel technology for direct antibody selection on 2-D blot. *Journal of Biochemistry.* 132: 245-251, 2002
- 2) Tanaka T, Ito T, Furuta M, Eguchi C, Toda H, Wakabayashi-Takai E, Kaneko K: *In situ* phage screening; a method for identification of subnanogram tissue components *in situ*. *Journal of Biological Chemistry.* 277: 30382-30387, 2002
- 3) Perrier V, Kaneko K, Safar J, Vergara J, Tremblay P, DeArmond SJ, Cohen FE, Prusiner SB, Wallace AC: Dominant-negative inhibition of prion replication in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 99: 13079-13084, 2002
- 4) Korth C, Kaneko K, Groth D, Heye N, Telling G, Mastrianni J, Parchi P, Gambetti P, Will R, Ironside J, Heinrich C, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB: Abbreviated transmission of Creutzfeldt-Jakob disease to mice expressing a novel chimeric prion protein transgene. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* in press
- 5) Hachiya NS, Sakasegawa Y, Sasaki H, Tsukita S, Kaneko K: Unfoldin (AIP2), an ATP-dependent unfolding chaperone, unfolds correctly folded substrates with broad specificity *in vitro*, and colocalizes with the septin complex *in vivo*. in submission

2) 学会発表

- 1) Kishida H, Sakasegawa Y, Yamakawa Y, Kuroiwa Y, Hachiya NS, Kaneko K. Protective prion-protein inhibited the scrapie formation. The 15th Naito Conference on Molecular Biological Approaches for Intractable Diseases, Shonan, Oct 2-5, 2002
- 2) Sakasegawa Y, Aoto K, Kamata R, Hachiya NS, Kaneko K. Membrane fractions from mouse neuroblastoma cells contained peptides derived from the cellular prion. The 15th Naito Conference on Molecular Biological Approaches for Intractable Diseases, Shonan, Oct 2-5, 2002
- 3) Hachiya NS, Sakasegawa Y, Sasaki H, Tsukita S, Kaneko K. A Novel protein unfolding chaperon "Unfoldin" unfolds proteins with broad specificity *in vitro*. The 15th Naito Conference on Molecular Biological Approaches for Intractable Diseases, Shonan, Oct 2-5, 2002

- 4) Kamata R, Sakasegawa Y, Hachiya NS, Kaneko K. The real time analysis of prion protein-localization using living cells. The 15th Naito Conference on Molecular Biological Approaches for Intractable Diseases, Shonan, Oct 2-5, 2002
- 5) Yamazaki K, Yamada E, Kanaji Y, Sato K, Takano K, Sakasegawa Y, Kaneko K. Regulation of Cellular Prion Protein (PrP^c) mRNA Expression by TSH in Human Thyroid Follicles. The 74th Annual Meeting of the American Thyroid Association. Los Angeles, Oct 9-13, 2002.
- 6) Hachiya NS, Sakasegawa Y, Jozuka A, Sasaki H, Tsukita S, Kaneko K. A novel ATP-dependent protein chaperone, Unfoldin. 42th American Society for Cell Biology Annual Meeting. San Francisco, Dec 14-18, 2002.

〔知的所有権の取得状況〕

なし

プリオン病モデルマウスとヒト・プリオン伝達試験

班 員：毛利資郎（九州大学・大学院医・実験動物）

班 員：三好一郎（東北大学・大学院医・動物実験施設）

研究協力者：松浦裕一（九州大学・大学院医・実験動物）

研究協力者：北本哲之（東北大学・大学院医・病態神経）

〔研究要旨〕

ヒト・プリオン蛋白質遺伝子導入モデルマウスのノックインマウスでは中枢神経以外の脾臓、腸間膜リンパ節、パイエル板の濾胞樹状細胞(FDC)にヒト・プリオンを腹腔内接種後、14日以内に異常なプリオン蛋白質の沈着が認められた。これらのFDCにおける早期検出が真の感染性を反映しているかを調べるために、腹腔内接種後75日のFDCにおける沈着と脳内接種後の発症もしくは脳組織における異常なプリオン蛋白質の沈着を調べ比較した。その結果、CJDの孤発例、遺伝性、硬膜移植後、変異型などFDC陽性と脳内接種後の伝達性は完全に一致した。したがって、FDCの早期沈着は脳内接種によるヒト・プリオンの感染性の有無と同様にプリオンの感染性を判定できることが示された。同時に、感受性の認められないFDC陰性CJDの存在も明らかとなった。

Estimation for a novel knock-in mouse as rapid and sensitive bioassay system for human-prions

Shirou MOHRI¹, Ichiro MIYOSHI², Yuich MATSUURA¹ and Tetsuyuki KITAMOTO³

1 Laboratory of Biomedicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

2 Institute for Animal Experimentation, 3 Department of Neurological Science,

Tohoku University Graduate School of Medicine

ABSTRACT

We have established a new bioassay system using transgenic mouse with human/mouse chimeric transgene by homologous recombination, so called knock-in mouse(Ki-ChM). In the Ki-ChM, accumulation of abnormal prion protein (PrP^{Sc}) could be detected in their FDCs of spleen, lymph nodes and Peyer's patches at the very early time after inoculation. It is big problem whether the accumulated PrP^{Sc} has infectivity and reflects transmissibility of human prion protein to the mice, or not.

To solve the problems, we inoculated 10% homogenate of PrP^{Sc} accumulated spleen from a Ki-ChM to the same strain of mice for serial passage. The serially inoculated mice were all diseased. On the other hand, various types of human prions from identical patients were inoculated differential two routes, with intraperitoneal or intracerebral administration. PrP^{Sc} accumulation in FDCs post 75 days with intraperitoneal administration were compared with the PrP^{Sc} accumulation in brain with intracerebral administration showing some symptoms. The level of the accumulation of the abnormal prion protein was quite corresponding. In addition, when the accumulation of the abnormal prion protein was not admitted in FDC, accumulation was not similarly admitted in the brain either. These result strongly suggested that early accumulation of PrP^{Sc} in FDC with intraperitoneal administration quite reflected prion transmissibility and infectivity to mice with intracerebral administration.

〔目的〕

われわれはヒト・プリオン蛋白質遺伝子導入によりヒト型のプリオン蛋白質を産生するプリオン病モデルマウスを開発した。これらのモデルマウスを用いるとクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) 由来プリオンの実験動物への伝達性が向上し、潜伏期間も著しく短縮された。特にノックインマウスでは中枢神経以外の脾臓、腸間膜リンパ節、パイエル板の濾胞樹状細胞 (FDC) にヒト・プリオンを腹腔内接種後、14 日以内に異常なプリオン蛋白質の沈着が認められた。この FDC における異常なプリオン蛋白質の沈着の早期検出が真の感染性を反映しているかどうかは重要である。そこで、本年度はこの現象がヒト・プリオンに対する感受性を反映しているかどうかを調べることを目的とした。

〔材料と方法〕

1. ノックインマウス

マウスプリオン遺伝子の第 3 エクソンの SmaI サイト以降がヒト型プリオン遺伝子で、BstEII サイト以降の C 末端が再びマウス型プリオンタンパク質遺伝子となったキメラ構造の相同組換え遺伝子を有し、ヒト/マウスキメラ型蛋白質を発現するノックイン (Ki-ChM) マウスを用いた。

2. ヒト・プリオンの接種

孤発性 CJD (sCJD)、医原性 CJD (iCJD)、変異型 CJD (vCJD)、GSS の患者由来のヒト・プリオン (10% 脳乳剤) を Ki-ChM マウスに腹腔内接種 (IP) 50 μ l、もしくは脳内接種 (IC) 20 μ l をおこない、IP は 75 日後、IC 後は何らかのマウスプリオン秒の症状が出現するか、あるいはその他の病気、老化の兆候が激しくなった時点で安楽死をおこなった。安楽死させたマウスは全て緩衝ホルマリン液に固定後、実験室内汚染防止のために蟻酸処理を行い、常法によりパラフィン切片を作製、HE 染色と免疫組織染色を行った。免疫組織染色は hydrolytic autoclaving 法による前処理の後、一次抗体として抗 PrP^{Sc} 末ウサギ血清を用いた。

3. 脾臓における異常プリオン蛋白質の感染性の有無

Ki-ChM に沈着した異常プリオン蛋白質に感染性があるかどうかを調べるために、孤発性 CJD 由来プリオン H3 を IC 後 161 日と、英国の vCJD 由来プリオン 96/02 を IP 後 75 日にそれぞれ安楽死させ、採取された Ki-ChM マウスの脾臓について 2 等分し一片を免疫組織検査用にホルマリン固定し、残りを Ki-ChM マウスの IC による継代接種に用いた。

4. 脳内接種による発症と腹腔内接種後の FDC 早期沈着との関連性

脳内接種後の発症もしくは発症に至らないまでも病理組織診断時の免疫組織染色で脳組織に異常なプリオン蛋白質の沈着が認められた個体については affected として、脳内接種による感染伝達が成立したと判定し、腹腔内接種後 75 日の FDC における異常なプリオン蛋白質の早期沈着の有無と比較した。

5. 接種材料中の PrP^{Sc} の含有について

接種に用いた 10% ヒト脳乳剤中のプリオン存在の確認と量的変異がマウスへの感染性に反映されているか否かを調べるために、接種脳乳剤の 0.6mg 脳湿重量当量を用いて SDS-PAGE を行い、3F4 抗体にてウエスタンブロットをおこなった。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては、九州大学大学院医学研究院動物実験指針に従い、動物実験委員会による実験計画書の審査を受け、感染実験は物理的封じ込め設備を有する専用の感染動物実験室でおこなった。

〔結果〕

sCJD については IP 接種 75 日後の FDC における異常なプリオン蛋白質沈着が必発するグループ、わずかに沈着が認められるグループ、まったく沈着しないグループの 3 通りが認められた。沈着必発のグループは IC 後も 134 日から 153 日の潜伏期間で全て発症した。わずかに沈着が認められたグループ