

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 15 年度 総括・分担研究報告書

平成 16 年 3 月

主任研究者 片峰 茂

## はじめに

平成15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16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  
～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 1

### II. 分担研究報告書

#### 1. プリオン類似蛋白遺伝子の構造と機能に関する研究

長崎大・院医・感染分子病態学 片峰 茂 7

#### 2. 特発性プリオン病の疾患感受性因子及びプリオン

蛋白相互作用因子に関する研究

東北大・院医・プリオン蛋白分子 堂浦 克美 13

#### 3. 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

北海道大・院獣医・プリオン病学 堀内 基広 20

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 27

## 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	T095-849-7057 F095-849-7060
分担研究者	堂浦 克美	東北大学大学院 医学系研究科 プリオン蛋白分子	教授	T022-717-8232 F022-717-8148
分担研究者	堀内 基広	北海道大学大学院 獣医学研究科 プリオン病学講座	教授	T011-706-5293 F011-706-5293

# 総括研究報告

## 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

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して研究を行い、以下の成果を得た。(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<sup>C</sup> は PrPLP/Dpl の神経変性作用を用量依存性に阻害することが判明した。(2) この PrP<sup>C</sup> の神経防御作用には Cu<sup>2+</sup>結合部位とされる Octa-repeat 領域を含む N 末配列が必須であることが判った。(3) C1qRp 遺伝子において CJD 群と対照群とで有意に異なる遺伝子多型を認めた。(4) 4 種のマウス株化細胞をプリオン感受性・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い、発現に変化が認められた遺伝子断片を 2 つ同定した。

### 分担研究者

堂浦克美（東北大学大学院医学系研究科）  
堀内基広（北海道大学大学院獣医学研究科）

### 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。

### 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 (Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup>) マウスに惹起される小脳プルキンエ細胞変性死にはプリオン蛋白 (PrP<sup>C</sup>) 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がある。このことを証明するために、NSE プロモーターあるいはプルキンエ細胞特異的に発現する PCP-2 プロモーターの下流に PrPLP 遺伝子の翻訳領域を挿入した NSE-PrPLP 及び PCP2-PrPLP プラスミドを導入し、Tg マウスを作製した。これらマウスを PrP<sup>C</sup> の機能は消失しているが PrPLP/Dpl を発現しない別系統の *Zrch 1 Prnp*<sup>0/0</sup> マウスと交配し、*Prnp* 遺伝子型の異なる (*Prnp*<sup>0/0</sup>、*Prnp*<sup>0/+</sup>、*Prnp*<sup>+/+</sup>) の Tg マウス系統を得た。さらに、PrP<sup>C</sup> の機能における N 末反復配列の役割解明のため、同領域を欠失する変異 *Prnp* 遺伝子を Ngsk *Prnp*<sup>0/0</sup> に導入した。

(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：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系蛋白質に注目し、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 48 例の特発性ヤコブ病患者と 51 例の対照者において、これらの遺伝子の多型と疾患との関連を検討した。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 産物を鋳型にしてシークエンス反応を行い、CR1 の exon19/22/33 における一塩基多型については、制限酵素で切断し、断片長多型を調べた。

(3) PrP 相互作用因子の探索：組換えマウス PrP (121-231) をビオチン標識シアビジン磁気ビーズに結合させ、PrP アフィニティカラムを作製した。非感染マウス神経芽細胞腫細胞 (N2a) と感染細胞で異常型 PrP が常時発現しているマウスの神経芽細胞腫細胞 (N2aSc) のタンパク質を生合成ラベルした後、細胞抽出液から密度勾配遠心法にて PrP を含むラフト画分を分画した。このラフト画分を PrP アフィニティカラムに結合させた。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：マウス PrP をコードする遺伝子断片を挿入した発現ベクター-pEF-MoPrP を各種細胞株に導入してネオマイシン耐性細胞を選抜し、PrP<sup>C</sup> 高発現クローンを得た。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<sup>C</sup> 過発現細胞株と共培養してネオマイシン存在下で連続継代することにより感染を試みた。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<sup>Sc</sup> の産生におよぼす影響を WB 法にて解析した。PrP<sup>Sc</sup> を産生する細胞株、および産生しなくなった細胞株における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。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. 研究結果

(1) PrPLP/Dpl による神経変性死の分子機構の解析：全ての Tg(PrPLP/Dpl). *Zrch-Prnp*<sup>0/0</sup> マウスは小脳失調性歩行を来し Purkinje 細胞変性死を呈した。また、これに遅れて、Tg(PrPLP/Dpl). *Zrch-Prnp*<sup>0/+</sup> マウスの一部でも Purkinje 細胞変性死が認められた。しかし、Tg(PrPLP/Dpl). *Zrch-Prnp*<sup>+/+</sup> マウスでは Purkinje 細胞変性死は認められなかった。つまり、これらの結果は、Ngsk-*Prnp*<sup>0/0</sup> マウスに認められた Purkinje 細胞変性死が細胞それ自身における PrPLP/Dpl の過剰発現によって起こり、また PrP<sup>C</sup> 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意味している。最近、スイスのグループが *Zrch-Prnp*<sup>0/0</sup> に N 末領域欠損型 PrP (PrPLP/Dpl と類似の構造) を発現させると同様の神経細胞死が起ることを明らかにした。

すなわち、PrP<sup>C</sup>と結合する未知の機能分子をPrPLP/Dpl（あるいはN末領域欠損型PrP）が占拠し、細胞生存に必須のシグナル伝達を阻害する（あるいは細胞死シグナルをプロモートする）との仮説が成立する。プリオン病では構成的PrP立体構造変換によりPrP<sup>C</sup>の機能消失が起り、蓄積したPrP<sup>Sc</sup>がPrPLP/Dplと同様の神経毒性を発揮すると仮定すれば、Ngsk-Prnp<sup>0/0</sup>は有用なプリオン病神経変性モデルということになる。次に、PrPLP/Dplの神経毒性とそれに拮抗するPrP<sup>C</sup>の防御作用の分子機構にアプローチするために、いくつかのキメラあるいは変異型PrP遺伝子トランスジェーンをNgsk-Prnp<sup>0/0</sup>に再導入した。そのうちN末66アミノ酸(residues 23-88)を欠く欠失変異型PrPはNgsk-Prnp<sup>0/0</sup>の神経変性を防御することができなかった。従来PrP<sup>C</sup>はCu<sup>2+</sup>の細胞内取り込みや代謝に関与するとの説があったが、この領域はCu<sup>2+</sup>結合部位とされるOcta-repeat領域に相当する。PrP<sup>C</sup>の神経変性防御作用にはCu<sup>2+</sup>が関与することが示唆され、ひいてはCu<sup>2+</sup>がPrPLP/DplとPrPの拮抗作用の標的分子である可能性も考えられた。

(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の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。その他の遺伝子多型については、保有率に有意差を認めなかった。脾臓の異常プリオン蛋白沈着と、これらの補体系蛋白の発現パターンを免疫組織化学的に解析したところ、時間的・空間的に局在が一致していることが明らかとなった。

(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 7.2の条件で結合反応を行ったところ、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。しかし、さらに詳細な検討の結果、非特異的であることが判明した。プリオ

ン蛋白に作用するラフト中の因子としてプリオン蛋白分解酵素の活性を検出した。この酵素活性は感染細胞と非感染細胞で差は見られなかった。

(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：プリオン持続感染細胞I3/I5-9はOpti-MEMで培養するとプリオンの感染を維持できるが、D-MEMで培養するとプリオン非感受性となる。I3/I5-9のプリオン感受性に関連する培地成分を同定するために、D-MEMに種々の培地成分を加えてプリオン感受性を調べたところ、脂肪酸混合物CDLCを添加した場合、Opti-MEMで培養したときの10-20%のPrP<sup>Sc</sup>を産生するようになった。また、I3/I5-9がプリオン増殖を許容する培養条件と許容しない培養条件下での遺伝子発現の比較を2種類の方法で解析した。その結果、これまでに、2種の解析法に共通して変化が認められた遺伝子断片を2つ同定した。さらに、マウスPrP<sup>C</sup>を過発現する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のプリオン感受性を、1)マウススクレイピー持続感染細胞I3/I5との共培養によるプリオン感染成立、および、2)脳乳剤の接種によるプリオン感染成立、の2通りの方法で調べた。その結果、供試した細胞中N2aのみがプリオン感受性であった。

## D. 考察

プリオン類似蛋白PrPLP/Dplの神経細胞における細胞死誘導作用を証明することができ、加えてPrP<sup>C</sup>のそれに対する拮抗的防御作用も判明し、所期の目的は達成された。神経細胞死に係るPrPLP/DplとPrP<sup>C</sup>の拮抗的作用を明らかにした学術的意義は大きく、国際的にも評価された。プリオン病では構成的PrP立体構造変換によりPrP<sup>C</sup>の機能消失が起り、蓄積したPrP<sup>Sc</sup>がPrPLP/Dplと同様の神経毒性を発揮するということ新たなプリオン病神経変性モデルを提唱するものとなった。その観点からはNgsk-Prnp<sup>0/0</sup>は有用なモデルマウスである。神経細胞死に係るPrPLP/DplとPrP<sup>C</sup>の拮抗的作用の分子機構解明が今後の課題である。そのことによりプリオン病のみならず神経変性一般に関する理解を大きく前進させること



につながる。また、モデルマウスとしての Ngsk-Prnp<sup>0/0</sup> は今後治療法開発のためのモデルとしての応用が期待される。

従来 PrP<sup>C</sup> は Cu<sup>2+</sup> の細胞内取り込みや代謝に関与するとの説があったが、この領域は Cu<sup>2+</sup> 結合部位とされる Octa-repeat 領域に相当する。PrP<sup>C</sup> の神経変性防御作用には Cu<sup>2+</sup> が関与することが示唆され、ひいては Cu<sup>2+</sup> が PrPLP/Dpl と PrP の拮抗作用の標的分子である可能性も考えられた。Cu<sup>2+</sup> は radical oxygen species (ROS) の代謝に必須の分子であることはよく知られている。しかし、これまでの我々の実験では Cu/Zn-SOD 活性を含めて Ngsk-Prnp<sup>0/0</sup> 神経細胞における ROS 代謝異常は認められていない。PrPLP/Dpl の神経毒性と拮抗的 PrP<sup>C</sup> の防御作用の分子機構解明は今後の重要な課題である。

疾患感受性遺伝子に関しては C1qRp 遺伝子を除いて解析した補体関連遺伝子多型と孤発性 CJD 発症との連鎖を見出すことはできなかった。しかしながらリンパ系組織におけるプリオン複製と補体関連蛋白の相関を示す間接的な証拠を見出すことができた。疾患感受性遺伝子候補としての補体関連遺伝子多型改析を、英国で多発する新変異型 CJD に拡大する必要がある。新変異型 CJD は牛プリオン病が食を介してヒトに伝播したものであり、伝播にリンパ系組織が関与していることは明らかであるからである。

プリオン複製に関わる宿主因子の探索研究においては、目的の分子の同定にはいたらなかった。しかしプリオン感受性の差に基づく網羅的遺伝子改析により有力候補分子を2種得ている。現在の研究をさらに推進することにより近々目的分子に到達できるものと期待している。その際モノクローナル抗体 mAb6H10 は大きな役割を果たすものと考えている。

## 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<sup>C</sup> は PrPLP/Dpl の神経変性作用を用量依存性に阻害することが判明した。(2) この PrP<sup>C</sup> の神経防御作用には Cu<sup>2+</sup> 結合部位とされる Octa-repeat 領域を含む N 末配列が必須であること

が判った。(3) C1qRp 遺伝子において CJD 群と対照群とで有意に異なる遺伝子多型を認めた。

(4) 4 種のマウス株化細胞をプリオン感受性・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い、発現に変化が認められた遺伝子断片を2つ同定した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Furukawa H, Doh-ura K, Okuwaki R, Shirabe S, Yamamoto K, Udono H, Ito T, Katamine S, Niwa M: A pitfall in diagnosis of human prion diseases using detection of protease-resistant prion protein in urine: Contamination with bacterial outer membrane proteins. *J Biol Chem* in press (2004)

Doh-ura K, Ishikawa K, Murakami-Kubo I, Sasaki K, Mohri S, Race R, Iwaki T: Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models. *J Virol* (in press)

Ishikawa K, Doh-ura K, Kudo Y, Murakami-Kubo I, Ando Y, Sawada T, Iwaki T: Amyloid imaging probes are useful for evaluation and treatment of transmissible spongiform encephalopathies. *J Gen Virol* (in press)

Murakami-Kubo I, Doh-ura K, Ishikawa K, Kawatake S, Sasaki K, Kira J, Ohta S, Iwaki T: Quinoline derivatives are therapeutic candidates for transmissible spongiform encephalopathies. *J Virol* 78:1281-1288, 2004

Jin K, Shiga Y, Shibuya S, Chida K, Sato Y, Korno H, Doh-ura K, Kitamoto T, Itoyama Y: Clinical features of Creutzfeldt-Jakob disease with V180I mutation. *Neurology* 62:502-505, 2004

Tsuji Y, Kanamori H, Murakami G, Yokode M, Mezaki T, Doh-ura K, Taniguchi K, Matsubayashi K, Fukuyama H, Kita T, Tanaka M: Heidenhain variant of Creutzfeldt-Jakob disease: diffusion-weighted MRI and PET characteristics. *J Neuroimaging* 14:63-66, 2004

Kim C-L, Umetani A, Matsui T, Ishiguro N, Shinagawa M, and Horiuchi M: Antigenic characterization of an abnormal isoform of prion protein using a new diverse panel of monoclonal antibodies. *Virology* 320: 41-52, 2004

Atarashi R, Nishida N, Shigematsu K, Goto S, Kondo T, Sakaguchi S, Katamine S: Deletion of N-terminal residues 23-88 from prion protein (PrP) abrogates the potential to rescue PrP-deficient mice from PrP-like protein/doppel-induced Neurodegeneration. *J Biol Chem* 278(31): 2003, 28944-28949.

Watarai M, Kim S, Erdenebaatar J, Makino S, Horiuchi M, Shirahata T, Sakaguchi S, Katamine S: Cellular prion protein promotes Brucella infection into macrophages. *J Exp Med* 198(1): 2003, 5-17.

Yukitake M, Satoh J, Katamine S, Kuroda Y: EAAT4 mRNA expression is preserved in the cerebellum of prion protein-deficient mice. *Neurosci Lett.* ; 352(3): 2003, 171-174.

Ando Y, Haraoka K, Terazaki H, Tanoue Y, Ishikawa K, Katsuragi S, Nakamura M, Sun X, Nakagawa K, Sasamoto K, Takesako K, Ishizaki T, Sasaki Y, Doh-ura K: A novel tool for detecting amyloid deposits in systemic amyloidosis in vitro and in vivo. *Lab Invest* 83:1751-1759, 2003

Sasaki K, Doh-ura K, Furuta A, Nakashima S, Morisada Y, Tateishi J, Iwaki T: Neuropathological features of a case with schizophrenia and prion protein gene P102L mutation before onset of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *Acta Neuropathol* 106: 92-96, 2003

Nishida T, Tokumaru AM, Doh-ura K, Hirata A, Motoyoshi K, Kamakura K: Probable sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with valine homozygosity at codon 129 and bilateral middle cerebellar peduncle lesions. *Intern Med* 42:199-202, 2003

Gombojav, A., Shimauchi, I., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Kitamoto, T., Miyoshi, I., Mohir, S., and Takata, M. Susceptibility of Transgenic Mice Expressing Chimeric Sheep, Bovine and Human PrP Genes to Sheep Scrapie. *J. Vet. Med. Sci.* 65: 341-347, 2003.

Okamoto, M., Furuoka, H., Horiuchi, M., Noguchi, T., Hagiwara, K., Muramatsu, Y., Tomonaga, K., Tsuji, M., Ishihara, C., Ikuta, K., and Taniyama, H. Experimental Transmission of Abnormal Prion Protein (PrP<sup>Sc</sup>) in the Small Intestinal Epithelial Cells of Neonatal Mice. *Vet Pathol.* 40: 723-727, 2003.

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).

調瀬、片峰茂：プリオン病の病態モデルマウスにおける運動失調 「神経疾患と分子病態モデルをめぐるトピックス」 CLINICAL NEUROSCIENCE 21 巻2号、171-173、2003

片峰茂：プリオン病 「図説分子病態学（3版）」（一瀬白帝、鈴木宏治編著）中外医学社、pp 368-371、2003

堂浦克美：プリオン病治療薬の開発 神経研究の進歩、47:109-118, 2003

堂浦克美：プリオン病研究の進歩、脳科学研究の現状と課題 杉田秀夫、高橋清久編集、311-315 頁、平成 15 年 9 月、じほう社、東京

堀内 基広 抗 PrP 抗体によるプリオン増産抑制とプリオン病治療の可能性 最新医学 58(12): 2802-2808 (2003)

堀内 基広 牛海綿状脳症問題に関する最近の動向 老人精神医学 14: 1488-1494 (2003)

## 2. 学会発表

Doh-ura K: "Experimental animal studies on pertosan polysulphate." Case conference on Jonathan Simms. An inter-disciplinary meeting. Belfast, UK, September 2003

Kawatake S, Doh-ura K, Murakami-Kubo I, et al: "Interaction of anti-prion chemicals with prion protein analyzed by surface plasmon resonance." International prion conference. München, Germany, October 2003

1) 片峰茂: 「プリオン病研究の最前線と治療予防への展望」第77回日本薬理学会年会、教育講演、大阪、2004年3月

2) 新竜一郎、西田教行、坂口末廣、片峰茂: 「変異 PrP による PrPres の dominant-negative 抑制効果はプリオン株により異なる」第51回日本ウイルス学会総会、京都、2003年10月

3) 吉川大介、西田教行、片峰茂、坂口末廣: 「プリオン蛋白特異的 siRNA によるプリオン抑制効果の検討」第51回日本ウイルス学会総会、京都、2003年10月

4) 渡辺健、西田教行、小林信之、坂口末廣、片峰茂: 「パルスラベルチェース法によるプリオン蛋白質生成・分解検出系の確立」第51回日本ウイルス学会総会、京都、2003年10月

5) Katamine S et al.: Role of blood-brain barrier in infection of TSE agents. International prion conference. München, Germany, October

Doh-ura K: "Interaction of prion protein and anti-prion chemicals." 第76回日本生化学会大会、シンポジウム、横浜、2003年10月

堂浦克美: 「プリオン病の治療戦略」第26回日本医学学会総会学術講演会、痴呆の克服、シンポジウム、福岡、2003年4月

堂浦克美: 「プリオン病の治療」第44回日本神経学会総会、シンポジウム、横浜、2003年5月

堂浦克美: 「ヒトプリオン病の現況」第51回日本輸血学会総会、シンポジウム、北九州、2003年5月

堂浦克美: 「BSE とヒトプリオン病」第24回衛生微生物技術協議会総会、シンポジウム、福岡、2003年7月

堂浦克美: 「抗プリオン作用を持つ化合物の性質」生体分子ダイナミクスと機能立体構造形成研究会、岡崎、

2003年12月

堀内 基広、梅谷 淳、工藤 聡子、石黒 直隆、横山 隆、品川 森一: BSE スクリーニング用 ELISA (ORF ELISA) の開発とその性能評価 第135回日本獣医学会

大林 浩二、堀内 基広、石黒 直隆、品川 森一: プリオン蛋白質と結合するペプチド性リガンドの探索 第135回日本獣医学会

田村 勇耕、堀内 基広、石黒 直隆、古岡 秀文、品川 森一: 尿崩症を誘発するマウス順化スクレイピー株の分離と解析 第135回日本獣医学会

金 チャンラン、品川 森一、石黒 直隆、堀内 基広: 抗 PrP 抗体パネルによる正常プリオン蛋白質の細胞内局在マッピング 第51回日本ウイルス学会

前田 秋彦、金 チャンラン、田村 勇耕、品川 森一、堀内 基広: オクタペプチドリピートを認識する抗 PrP 抗体による BSE とスクレイピー自然例の識別 第51回日本ウイルス学会

菊池 宏明、品川 森一、石黒 直隆、堀内 基広: プリオン感受性・非感受性細胞の選別 第51回日本ウイルス学会

## G. 知的所有権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

桑田一夫・西田教行・片峰茂, 「アミロイド前駆体特殊構造形成阻害剤」, 特願 2003-355617、平成15年11月26日出願

工藤幸司、澤田徹、堂浦克美: プリオン蛋白蓄積性疾患の診断プローブおよび治療薬ならびにプリオン蛋白の染色剤. PCT/JP03/11056、2003年8月2日

# 分 担 研 究 報 告

プリオン類似蛋白遺伝子の構造と機能に関する研究

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、西田教行、新竜一郎、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

プリオン蛋白 (PrP) 欠損マウス (N<sub>gsk</sub>-Prnp<sup>0/0</sup>) に惹起される小脳 Purkinje 細胞変性におけるプリオン類似蛋白 PrPLP/Dpl の役割を明らかにするため、PrP<sup>C</sup> の機能は消失しているが PrPLP/Dpl を発現しない別系統のマウス ZrchI-Prnp<sup>0/0</sup> の background に、神経細胞または Purkinje 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-Prnp<sup>0/0</sup> を作製した。その結果、全ての Tg(PrPLP/Dpl).Zrch-Prnp<sup>0/0</sup> マウスは小脳失調性歩行を来し Purkinje 細胞変性死を呈した。また、これに遅れて、Tg(PrPLP/Dpl).Zrch-Prnp<sup>0/+</sup> マウスの一部でも Purkinje 細胞変性死が認められた。しかし、Tg(PrPLP/Dpl).Zrch-Prnp<sup>+/+</sup> マウスでは Purkinje 細胞変性死は認められなかった。つまり、これらの結果は、N<sub>gsk</sub>-Prnp<sup>0/0</sup> マウスに認められた Purkinje 細胞変性死が細胞それ自身における PrPLP/Dpl の過剰発現によって起こり、また PrP<sup>C</sup> 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意味している。次に、PrPLP/Dpl の神経毒性とそれに拮抗する PrP<sup>C</sup> の防御作用の分子機構にアプローチするために、いくつかのキメラあるいは変異型 PrP 遺伝子トランスジーンを N<sub>gsk</sub>-Prnp<sup>0/0</sup> に再導入した。そのうち N 末 66 アミノ酸 (residues 23-88) を欠く欠変異型 PrP は N<sub>gsk</sub>-Prnp<sup>0/0</sup> の神経変性を防御することができなかった。従来 PrP<sup>C</sup> は Cu<sup>2+</sup> の細胞内取り込みや代謝に関与するとの説があったが、この領域は Cu<sup>2+</sup> 結合部位とされる Octa-repeat 領域に相当する。PrP<sup>C</sup> の神経変性防御作用には Cu<sup>2+</sup> が関与することが示唆された。

A. 研究目的

我々が作製したプリオン蛋白 (PrP) 欠損マウス (N<sub>gsk</sub>-Prnp<sup>0/0</sup>) は正常に発生発育するが、50 週齢 (1 年) を過ぎた頃より小脳 Purkinje 細胞の変性・脱落が惹起される。すなわち正常蛋白 PrP<sup>C</sup> は神経細胞の生存維持に重要な機能を有し、その

機能消失により神経細胞変性が起ることを強く示唆するものであった。このことは、N<sub>gsk</sub>-Prnp<sup>0/0</sup> に正常 PrP 遺伝子を再導入することにより神経症状の出現が回避されることにより証明した。しかし、N<sub>gsk</sub>-Prnp<sup>0/0</sup> で見られた Purkinje 細胞変性が、スイス及び英国で作製された 2 系

統の PrP 欠損マウス (Zrch-Prnp<sup>0/0</sup>, Rcm-Prnp<sup>0/0</sup>) では起らず、この表現型の乖離をどう説明するかという謎が残った。構造解析の結果、Ngsk-Prnp<sup>0/0</sup> のみで、PrP 遺伝子スプライス・アクセプター破壊に基づく遺伝子間スプライシングというユニークな機構により、PrP 遺伝子と下流の新規遺伝子の癒合 mRNA が発現することが判明した。この mRNA は下流遺伝子の翻訳領域全長を含むため、PrP 遺伝子プロモーターにドライブされて下流遺伝子産物が Ngsk-Prnp<sup>0/0</sup> の神経細胞では異所性に発現する。米国のプルシナーのグループも異なるアプローチから、PrP 遺伝子の下流の同遺伝子を同定しその産物を Doppel と命名した。驚いたことに、この新規遺伝子産物 (PrPLP/Dpl) は PrP の N 末領域約 100 アミノ酸を欠く以外は PrP と高い相同性を有する膜糖蛋白であった。ちなみに、成体マウス脳組織では PrPLP/Dpl の発現は認められず、精巢に高い発現を認める。最近、スイスで樹立された PrPLP/Dpl 欠損マウスの雄に高頻度に不妊が認められるとの報告がなされている。本研究では、Ngsk-Prnp<sup>0/0</sup> における神経変性の分子機構を解明し、PrPLP/Dpl の機能に迫ることを目的とした。

## 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。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。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、PrPLP/Dpl を異なる Prnp 遺伝子型の背景で発現させる目的で、これらのマウスをそれぞれ Zrch I Prnp<sup>0/0</sup> マウスと交配した。

次に、マウス (Mo-Prnp)、ハムスター (Ha-Prnp)、2 種類のマウス/ハムスター・キメラ (MHM2 及び MH2M)、E199K 変異マウス (Mo-Prnp.E199K)、及び Octarepeat 領域欠損 (MHM2.del23-88) PrP 遺伝子を、それぞれのトランスジェニックマウス (TG マウス) との交配により Ngsk-Prnp<sup>0/0</sup> に導入した。

### 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 $\mu$ 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 hydrochloride (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/0.25% SDS/5x Denhart's solution を含む溶液にて 50°C、16 時間行った。その後、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-

choro-3-in-dolyl 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、プルキンエ細胞特異的に発現させるために 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。これらを用いて 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) 及び 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、ウェスタンブロットングにて脳内に 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、ウェスタンブロットングにて 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 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、ウェスタンブロットングでは検出できなかったと考えられる。

### 2) Tg(NSE-PrPLP/Dpl). ZrchI *Prnp*<sup>0/0</sup> と Tg(PCP2-PrPLP/Dpl). ZrchI *Prnp*<sup>0/0</sup> マウスにおけるプルキンエ細胞変性死

*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 マウスを ZrchI *Prnp*<sup>0/0</sup> と交配し、Tg(NSE-PrPLP/Dpl) 25. ZrchI *Prnp*<sup>0/0</sup>, Tg(NSE-PrPLP/Dpl) 25. ZrchI *Prnp*<sup>0/+</sup>, 及び Tg(NSE-PrPLP/Dpl) 25. ZrchI *Prnp*<sup>+/+</sup> マウスを得た。その結果、Tg(NSE-PrPLP/Dpl) 25. ZrchI *Prnp*<sup>0/0</sup> (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) 25. ZrchI *Prnp*<sup>0/+</sup> (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) 25. ZrchI *Prnp*<sup>+/+</sup> (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) 25. ZrchI *Prnp*<sup>0/0</sup> と Tg(NSE-PrPLP/Dpl) 25. ZrchI *Prnp*<sup>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が、Tg(NSE-PrPLP/Dpl) 25. ZrchI *Prnp*<sup>+/+</sup>

マウスではブルキンエ細胞は正常であった。これらの結果は、PrPLP/Dpl の神経細胞における過剰発現は *Prnp*<sup>0/0</sup> マウスにブルキンエ細胞特異的な変性死を惹起し、PrP<sup>C</sup> 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。

ブルキンエ細胞変性の分子機構をさらに解明するために、ブ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 マウスを *Zrch I Prnp*<sup>0/0</sup> マウスを交配さし、Tg(PCP2-PrPLP/Dpl)26. *Zrch I Prnp*<sup>0/0</sup>, Tg(PCP2-PrPLP/Dpl)26. *Zrch I Prnp*<sup>0/+</sup>, Tg(PCP2-PrPLP/Dpl)26. *Zrch I Prnp*<sup>+/+</sup> マウスを作製した。その結果、Tg(PCP2-PrPLP/Dpl)26. *Zrch I Prnp*<sup>0/0</sup> (n=5) と Tg(PCP2-PrPLP/Dpl)26. *Zrch I Prnp*<sup>0/+</sup> 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、病理学的検索にてブルキンエ細胞変性を呈した。しかし、Tg(PCP2-PrPLP/Dpl)26. *Zrch I Prnp*<sup>+/+</sup> 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。これらの結果は、ブルキンエ細胞死には細胞それ自身における PrPLP/Dpl の発現によることを示した。

### 3) マウス/ハムスター・キメラ及び変異型マウス PrP 遺伝子による Ngsk-Prnp0/0 神経変性の回復実験

次に、PrPLP/Dpl の神経毒性とそれに拮抗する PrP<sup>C</sup> の防御作用の分子機構にアプローチするために、いくつかのキメラあるいは変異型 PrP 遺伝子トランスジェンを Ngsk-Prnp<sup>0/0</sup> に再導入した。Mo-Prnp、Ha-Prnp、MH2M、MH2M、及び Mo-

Prnp.E199K はいずれも Ngsk-Prnp0/0 マウスにおけるブルキンエ細胞変性を阻止した。一方、N 末 66 アミノ酸 (residues 23-88) を欠く欠失変異型 PrP のみが Ngsk-Prnp<sup>0/0</sup> の神経変性を防御することができなかった。PrP<sup>C</sup> の神経防御作用において N 末領域が必須の機能を担うことが明らかとなった。

### D. 考察

PrPLP/Dpl の神経細胞における細胞死誘導作用とそれに対する PrP<sup>C</sup> の拮抗的防御作用も判明した。重要な点は PrPLP/Dpl の神経毒性発現には PrP<sup>C</sup> の完全機能消失は必須ではなく、両蛋白分子のあい反する機能の発現が両者の発現量の比に規定されることである。構造の類似性を考慮すれば、両者が共通のリガンドを共有し、PrPLP/Dpl は細胞死シグナルを PrP<sup>C</sup> は生存シグナルを細胞内へ伝達するとの仮説が成立する。現在、この未知リガンド探索の研究が進行中である。一方、両者が独立した分子機構で機能する可能性も捨てきれない。

従来 PrP<sup>C</sup> は Cu<sup>2+</sup> の細胞内取り込みや代謝に関与するとの説があったが、この領域は Cu<sup>2+</sup> 結合部位とされる Octa-repeat 領域に相当する。PrP<sup>C</sup> の神経変性防御作用には Cu<sup>2+</sup> が関与することが示唆され、ひいては Cu<sup>2+</sup> が PrPLP/Dpl と PrP の拮抗作用の標的分子である可能性も考えられた。Cu<sup>2+</sup> は radical oxygen species (ROS) の代謝に必須の分子であることはよく知られている。しかし、これまでの我々の実験では Cu/Zn-SOD 活性を含めて Ngsk-



Prnp<sup>0/0</sup> 神経細胞における ROS 代謝異常は認められていない。PrPLP/Dpl の神経毒性と拮抗的 PrP<sup>C</sup> の防御作用の分子機構解明は今後の重要な課題である。

#### E. 結論

プリオン類似蛋白 PrPLP/Dpl の神経細胞における細胞死誘導作用を証明することができ、加えて PrP<sup>C</sup> のそれに対する拮抗的防御作用も判明した。神経細胞死に係る PrPLP/Dpl と PrP<sup>C</sup> の拮抗的作用を明らかにした学術的意義は大きい。プリオン病では構成的 PrP 立体構造変換により PrP<sup>C</sup> の機能消失が起り、蓄積した PrP<sup>Sc</sup> が PrPLP/Dpl と同様の神経毒性を発揮するとという新たなプリオン病神経変性モデルを提唱するものとなった。その観点からは Ngsk-Prnp<sup>0/0</sup> は有用なモデルマウスである。神経細胞死に係る PrPLP/Dpl と PrP<sup>C</sup> の拮抗的作用の分子機構解明が今後の課題である。そのことによりプリオン病のみならず神経変性一般に関する理解を大きく前進させることにつながる。また、モデルマウスとしての Ngsk-Prnp<sup>0/0</sup> は今後治療法開発のためのモデルとしての応用が期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Watarai M, Kim S, Erdenebaatar J, Makino S, Horiuchi M, Shirahata T, Sakaguchi S, Katamine S.: Cellular prion

protein promotes Brucella infection into macrophages. *J Exp Med.* 198(1):5-17. (2003)

2) Atarashi R, Nishida N, Shigematsu K, Goto S, Kondo T, Sakaguchi S, Katamine S.: Deletion of N-terminal residues 23-88 from prion protein (PrP) abrogates the potential to rescue PrP-deficient mice from PrP-like protein/doppel-induced neurodegeneration. *J Biol Chem.* 278(31):28944-9. (2003)

3) Yukitake M, Satoh J, Katamine S, Kuroda Y.: EAAT4 mRNA expression is preserved in the cerebellum of prion protein-deficient mice. *Neurosci Lett.* 352(3):171-4, (2003)

4) Furukawa H, Doh-ura K, Okuwaki R, Shirabe S, Yamamoto K, Udono H, Ito T, Katamine S, Niwa M: A pitfall in diagnosis of human prion diseases using detection of protease-resistant prion protein in urine: Contamination with bacterial outer membrane proteins. *J Biol Chem.* In press (2004)

5) 調漸、片峰茂: プリオン病の病態モデルマウスにおける運動失調 「神経疾患と分子病態モデルをめぐるトピックス」 CLINICAL NEUROSCIENCE 21 巻 2 号、171-173、2003

6) 片峰茂: プリオン病 「図説分子病態学 (3 版)」 (一瀬白帝、鈴木宏治編著) 中外医学社、pp 368-371、2003

##### 2. 学会発表

1) 片峰茂: 「プリオン病研究の最前線と治療予防への展望」 第 77 回日本薬理学会

年会、教育講演、大阪、2004年3月

2)新竜一郎、西田教行、坂口末廣、片峰茂：「変異 PrP による PrPres の dominant-negative 抑制効果はプリオン株により異なる」第 51 回日本ウイルス学会総会、京都、2003 年 10 月

3)吉川大介、西田教行、片峰茂、坂口末廣：「プリオン蛋白特異的 siRNA によるプリオン抑制効果の検討」第 51 回日本ウイルス学会総会、京都、2003 年 10 月

4) 渡辺健、西田教行、小林信之、坂口末廣、片峰茂：「パルスラベルチェース法によるプリオン蛋白質生合成・分解検出系の確立」第 51 回日本ウイルス学会総会、京都、2003 年 10 月

5) Katamine S et al. : Role of blood-brain barrier in infection of TSE agents. International prion conference. München, Germany, October

#### H.知的所有権の出願・登録状況

桑田一夫・西田教行・片峰茂，「アミロイド前駆体特殊構造形成阻害剤」，特願 2003-355617、平成 15 年 11 月 26 日出願

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 東北大学大学院医学系研究科教授

研究協力者 佐々木健介（九州大・院医・脳研病理）、西村有起（東北大・院医・プリオン）

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系蛋白質に注目し、48例の特発性ヤコブ病患者と51例の対照者において、これらの遺伝子の多型と疾患との関連を検討した。その結果、C1qRP 遺伝子の多型 P559S において疾患確定群と対照群とで有意差を認めたと、その他の遺伝子多型については、保有率に有意差を認めなかった。脾臓の異常プリオン蛋白沈着と、これらの補体系蛋白質の発現パターンを免疫組織化学的に解析したところ、時間的・空間的に局在が一致していることが明らかとなった。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、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種の蛋白質の存在が明らかになったが、さらに詳細な検討の結果、非特異的であることが判明した。プリオン蛋白に作用するラフト中の因子としてプリオン蛋白分解酵素の活性を検出した。この酵素活性は感染細胞と非感染細胞で差は見られなかった。

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85%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った。補体系蛋白質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、補体系蛋白質の発現を抑制、あるいは補体系レセプターである 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。

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、補体系レセプターである C1qRp、C1qBP、CR1、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 について遺伝子解析を行ってきた。最終年度は、さらに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

を行うとともに、脾臓の異常プリオン蛋白沈着とこれらの補体系蛋白の関連について免疫組織化学的検討を加えた。

一方、プリオン病の伝播、発症には種々の蛋白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蛋白質の検索を引き続き行った。

## B. 研究方法

### (i) 疾患感受性因子の検討

試料：九州大学脳研病理学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症例の DNA の計 28 サンプルと、臨床的に強くプリオン病が疑われた 20 症例の末梢白血球 DNA サンプルについて検討した。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から 51 例のサンプルを検討した。

遺伝子解析： 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。CR1 についてはこれまでに遺伝子多型が報告されている領域と、C3/C4 が結合する領域を増幅し、CR2、C1qBP、C1qRP については全てのエクソンを網羅するようにプライマーをデザインした。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、DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech 社)によるジデオキシ法でシークエンス反応を行い、ABI PRISM 310 (Applied Biosystems 社)にて DNA シークエンスを解析した。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、断片長多型を調べた。確認された遺伝子多型について、遺伝子型の分布を疾患群と対照群とで比較するために、カイ二乗検定を行った。

### (ii) 補体系蛋白質の免疫組織化学的検討

NZW マウスに福岡 1 株を接種した感染マウスの脾臓のホルマリン固定パラフィン包埋切片を、プリオン蛋白に対する抗体 PrP-C (IBL 社)と CR-1 に対する抗体 CD35 (Dako 社)あるいは clusterin に対する抗体抗 clusterin 抗体 (Snta Cluz 社)を用いて 2 重免疫染色を行った。また、lymphotoxin  $\beta$  receptor-Ig により follicular dendritic cell の分化を抑制したプリオン伝播抑制モデルマウスの脾臓組織 (Mabbott NA, et al. Nat Med 2001, 7:485-487) (Neuropathogenesis Unit, IAH, Edinburgh の Neil A. Mabbott 博士より供与)において、異常プリオン蛋白沈着、