

灰白質へのびまん性異常 PrP 沈着や海綿状変性というプリオン病の典型的所見には乏しかった。正常脳を接種された Tg マウスの脳組織には上述の異常所見は認められなかった。生化学的にも、プリオン接種 Tg マウスの脳組織中に蛋白分解酵素耐性の異常化した分泌型 PrP が検出された。一方、正常脳を接種された Tg マウスの脳組織中には異常型 PrP は検出されなかった。

5) プリオンを接種された野性型マウスおよび Tg マウス脳組織中のプリオンの検出：プリオンを接種された後に発症し、接種後 165 日で屠殺された野性型マウス、およびプリオン接種後 433 日ないし 441 日後に屠殺された 2 匹の Tg マウスの脳乳剤を作製し、プリオン濃度測定用の NZW モニターマウスへ接種した。NZW マウスは、いずれの接種材料の場合も接種後約 140 日で発症し、プリオンを接種された野性型マウスおよび Tg マウスの脳組織中においてプリオンが増殖していたことが確認された。

#### 【考察】

分泌型 PrP はマウス脳組織内でプリオン接種に依存して異常化し、プリオンを形成した。また、分泌型 PrP はプリオン接種に依存して、アミロイドを形成した。これらの観察から、GPI アンカーはプリオン蛋白の異常化、アミロイド形成、プリオン形成に不必要であることが明らかとなった。言い換えると、プリオン蛋白のペプチド部分には、少なくとも *in vivo* におけるプリオン形成に必要な条件が全て備わっていると言える。このことは、他のアミロイド形成性蛋白が一般にプリオン形成能に乏しいのは、GPI アンカーを持たないためではなく、ペプチド部分の構造がそれに適していないためであることを示唆している。この見解は、逆に「アミノ酸配列がある条件を満たせば PrP 以外の蛋白がプリオン様の振る舞いをする可能性がある」という考えを支持する。

GPI アンカーを欠く異常型 PrP の蓄積と高濃度のプリオン蓄積にも拘わらず、海綿状変性が生じなかったことは、脳組織に蓄積した異常型 PrP が神経変性を惹起する上で、GPI アンカーが重要な役割を果たす可能性を示唆している。GPI アンカーの欠損は PrP 分子の構造、局在、さらには PrP と他の分子との相互作用に影響を与える。どの要素への影響が神経変性能の低下をもたらしたかについては、さらに検討が必要である。この問題と関連して、GPI アンカーを欠く異常型 PrP が組織内、あるいは細胞内のどこに局在するかを、今後明らかにすることが重要である。免疫染色における異常 PrP 局在パターンの大きな変化は、GPI アンカーを欠く異常型 PrP が GPI アンカーを持つ異常型 PrP の場合とは異なる部位へ蓄積している可能性を示唆している。今後さらに、電子顕微鏡レベルの形態学的解析や生化学的手法を用いたラフト分画の解析等を行い、異常化した分泌型 PrP の局在についての情報を得る予定である。本研究のデータは、「異常型 PrP による神経変性の惹起には、神経細胞表面における PrP の発現が必要である」とする考えを支持する。<sup>3)</sup>

本研究のデータは、GPI アンカーを欠く合成ないし組換え PrP も、至適なコンフォメーションを取った場合にはプリオン化する可能性があることを示唆しており、合成ないし組換え PrP を使って試験管内でプリオンを新生または増殖させようとする実験に理論的根拠を与える。

#### 【参考文献】

- 1) Tateishi J, Ohta M, Koga M, Sato Y, Kuroiwa Y: Transmission of chronic spongiform encephalopathy with Kuru plaques from humans to small rodents. *Ann Neurol* 5: 581-584, 1979
- 2) Kitamoto T, Yi R, Mohri S, Tateishi J: Cerebral amyloid in mice with Creutzfeldt-Jakob disease is influenced by the strain of the infectious agent. *Brain Res* 508: 165-167, 1990
- 3) Brandner S, Isenmann S, Raeber A, Fisher M, Sailer A, Kobayashi Y, Marino S, Weissmann C, Aguzzi A: Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* 379: 339-343, 1996

#### 【研究発表】

##### 1. 論文発表

- 1) Kitamoto T, Mohri S, Ironside JW, Miyoshi I, Tanaka T, Kitamoto N, Itohara S, Kasai N, Katsuki M, Higuchi J,

Muramoto T, Shin R-W: Follicular dendritic cell of the knock-in mouse provides a new bioassay for human prions. *Biochem Biophys Res Commun* 294: 280-286, 2002

2) Sato K, Muramoto T, Tanaka T, Kitamoto N, Ironside JW, Nagashima K, Yamada M, Sato T, Mohri S, Kitamoto T: Association of an 11-12 kDa protease-resistant prion protein fragment with subtypes of dura graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease and other prion diseases. *J Gen Virol* 84: 2885-2893, 2003

3) Taguchi Y, Mohri S, Ironside JW, Muramoto T, Kitamoto T: Humanized knock-in mice expressing chimeric PrP showed varied susceptibility to different human prions. *Am J Pathol* 163: 2585-2593, 2003

4) 村本 環：プリオン蛋白変異と発病メカニズム。神経研究の進歩 47：29-35, 2003

5) 村本 環：プリオン蛋白の構造と病原性。第 121 回日本医学会シンポジウム記録集：56-64, 2003

## 2. 学会発表

1) 村本 環：欠損変異プリオン蛋白を用いたプリオン構造の解析。第 75 回日本生化学会大会シンポジウム「プリオン病」、京都、2002 年 10 月

2) 村本 環：プリオン蛋白の構造と病原性。第 44 回日本神経学会総会シンポジウム「日本におけるプリオン病（神経系感染症最近の話題）」、横浜、2003 年 5 月

3) 村本 環：プリオン蛋白の構造と病原性。第 3 回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「今日の蛋白質フォールディング研究 —フォールディング病研究をふくめて—」、札幌、2003 年 6 月

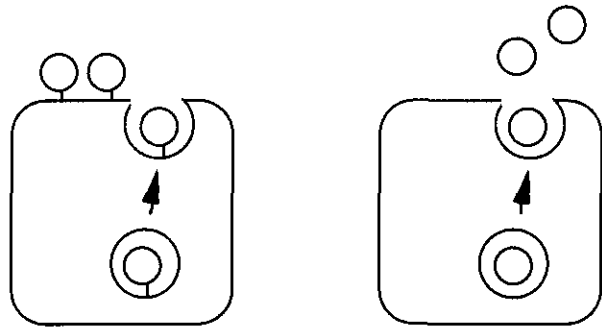
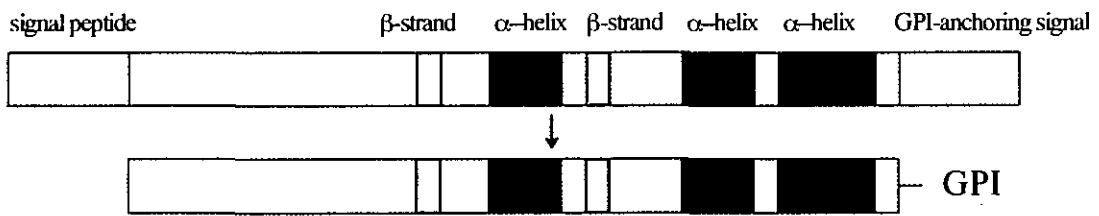


図 1. 野性型プリオン蛋白（左）と分泌型プリオン蛋白（右）

野性型プリオン蛋白



分泌型プリオン蛋白

231 番コドンを  
終止コドンで置換

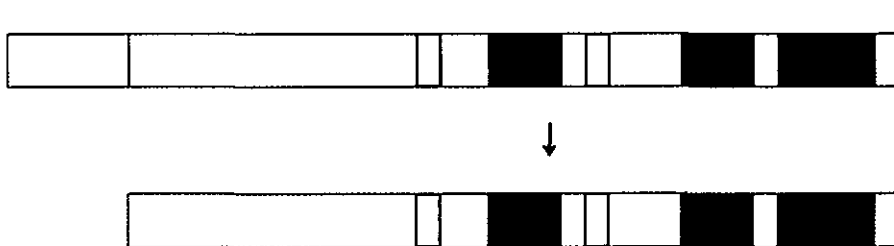


図 2. 分泌型プリオン蛋白のデザイン

## マイクロドメイン (マイクロドメイン) とプリオン感受性

班員：三好 一郎 (名古屋市立大学・大学院医・実験動物研究教育センター)  
班員：毛利 資郎 (九州大学・大学院医・実験動物学)  
研究協力者：宮本 智美 (名古屋市立大学・大学院医・実験動物研究教育センター)  
研究協力者：岡村 匡史 (東北大学・大学院医・動物実験施設)  
研究協力者：北本 哲之 (東北大学・大学院医・創生応用研・プリオン蛋白)  
研究協力者：平林 義雄 (理研・脳科学・神経回路)

### 【研究要旨】

ヒトグルコシルセラミド合成酵素(Ugcg)を高発現するトランスジェニックマウスを用い、スフィンゴ糖脂質合成系の活性化が、プリオンタンパク(PrP)の局在する生体膜のマイクロドメインの構造や機能に変化を導き、結果としてプリオンに対する感受性を修飾することが出来るか感染実験を行い検討した。期待に反して、対照群と顕著な相違は見られず、PrPの伝播の過程に影響が出る程度までマイクロドメインの構造を変化させるには発現する酵素活性が不十分と考えられた。また、プリオンの感染によって異常感染型プリオンタンパク(PrP<sup>Sc</sup>)が検出される臓器を中心に(脳および脾臓、血液細胞)、特に感染初期にマイクロアレイを用いてマイクロドメインに関連する遺伝子の発現プロファイルを行った。遺伝子の発現は脾臓、脳の順に経時的に変動し類似性が見られた。

### Microdomain (raft) and susceptibility to infectious prion

Ichiro MIYOSHI, Shirou MOHRI\*, Tomomi MIYAMOTO, Tadashi OKAMURA\*\*, Tetsuyuki KITAMOTO\*\*\*  
Yoshio HIRABAYASHI\*\*\*\*

Center for Experimental Animal Science, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences,  
\*Laboratory of Biomedicine, Graduate School of Medical Science, Kyushu University, \*\*Institute for Animal  
Experimentation, \*\*\*Department of Neurological Science, Tohoku University Graduate School of Medicine,  
\*\*\*\*Neuronal Circuit Mechanisms, Brain Science Institute, RIKEN

### ABSTRACT

We examined whether the activation of ceramide-glycosphingolipids biosynthesis pathway could modify the structure and function of microdomain in which prion protein (PrP) localized, and consequently had influence on the susceptibility to infectious prion by transmission study using transgenic mice expressing human glucosylceramide synthase (Ugcg). Incubation periods after inoculation of prion were indistinguishable between transgenic and control mice, indicating that Ugcg activity might not be sufficient to modify microdomain structure. We also attempted profile the expression of microdomain-related gene at initial phase of prion infection in organs in which abnormal prion protein (PrP<sup>Sc</sup>) were detected. The profile of the gene expression varied in order of spleen, brain and gave similarity between them.

### 【はじめに】

我々は、遺伝子組換えマウスに修飾した構造の PrP を発現させることでプリオン感受性モデルを開発しており、これは、PrP に特異的な感受性の付与と考えられる。一方、PrP が局在する微小環境な

どを変えることにより感受性（あるいは抵抗性）を増強することは、特異的な方法と相加的に利用可能な点から有意義である。PrP は GPI アンカー型タンパク質で、細胞膜のマイクロドメインに局在する。また、プリオンに起因する PrP の構造変換やその伝播には、マイクロドメインの存在およびその構造が影響することが示唆されている<sup>1)</sup>。マイクロドメインの主要構成成分は GPI アンカー型タンパク質およびコレステロール、スフィンゴ糖脂質、スフィンゴミエリンなどである。今回、Ugcg の高発現によりスフィンゴ糖脂質合成系を活性化し、さらにそれがセラミドを介してスフィンゴミエリンの合成系にも影響するためにマイクロドメインの構造や機能に変化を引き起こし、その結果としてプリオンに対する感受性を修飾できるか、トランスジェニックマウスを用いて感染実験を行った。次に、プリオン接種実験で最も病理学的変化の著しい脳、あるいは最も早期に PrP<sup>Sc</sup> が出現する脾臓、さらに血中の細胞（リンパ球やマクロファージなど）などでは、特にその初期にプリオン伝播に特徴的な遺伝子発現パターンが観察される可能性がある。マイクロドメイン構造の修飾に効果的な分子を検索するためにその組織で関連遺伝子発現プロファイリングを試みた。

## 【目 的】

ヒトグルコシルセラミド合成酵素(Ugcg)高発現トランスジェニックマウスを用いて感染実験を行い、スフィンゴ糖脂質合成系を活性化することでマイクロドメインの構造を変化させ、プリオンに対する感受性（抵抗性）を増強できるか検討した。また、マイクロドメイン関連分子の中に特異的なものは見いだせるか、in vivo 接種実験の感染初期における遺伝子発現プロファイリングを試みた。

## 【材料と方法】

昨年度の本班会議で報告したマウス PrP 遺伝子プロモータとヒト Ugcg cDNA から構築された導入遺伝子を持つトランスジェニックマウス(PrUgcg#1 及び#3)<sup>2)</sup>を用い、10%マウス脳乳剤（福岡 1 株）20 $\mu$ l を脳内接種し感染実験を行った。なお、対照として各々の同腹仔を用いた。

遺伝子発現プロファイリングでは、まず、C57BL/6 マウスの脳及び腹腔内に、各々20 $\mu$ l および 50 $\mu$ l の福岡 1 株 10%脳乳剤あるいは対照として正常マウス脳乳剤を接種した。それから 2 日および 10 日、30 日後に安楽死させ、採取した血液および脳、脾臓から TRIZOL を用いて mRNA を抽出・部分精製した。次に、この mRNA を蛍光標識し、DNA チップ（マウス完全長 cDNA データベース「FANTOM」を中心に、「MGI」「DDBJ」の 3 つの公共データベースを活用し開発され、機能既知・機能推定の 6400 遺伝子を搭載する。Oligo Size: 60mer Feature Size: 140~160 $\mu$ m House Keeping Gene:  $\beta$ -actin,  $\alpha$ -tubulin, Ribosomal Protein S19, GAPDH, transferrin receptor) を用いてハイブリダイゼーションを行い、得られたデータから Cy5/Cy3 を標準化し差が 2.0 以上のものを選択しクラスター解析などを行った。

## （倫理面への配慮）

全ての動物実験は、名古屋市立大学大学院医学研究科および東北大学大学院医学系研究科、九州大学大学院医学研究院の動物実験指針に従って行われた。

## 【結 果】

表 1 に示すように、感染実験で観察された潜伏期間は、PrUgcg#1 および#3 マウスで同腹仔群に対する傾向が一定せず、また、対照の同腹仔と顕著な差も認められなかった。

マイクロアレイ解析全体の傾向として、発現の変動している遺伝子の数は血液細胞および脳では 2 日>30 日>10 日、一方脾臓では 10 日>30 日>2 日であった（図 1）。また、クラスター解析により、遺伝子の発現は脾臓・脳の順に経時的に変動し類似性も見られたが、血液細胞のプロファイルは大きく異なっていた。さらに、テンプレートに用いた 6400 種の cDNA のうちデータベース上の annotation および gene の名称からマイクロドメインに関連する遺伝子群(約 250)を任意に抽出しプロファイルと比較した。その内、特に発現の変動の顕著な遺伝子を表 2 に示したが、輸送—あるいは chperone-, proteolysis-関連遺伝子も含め脾臓に比較して脳の遺伝子発現プロファイルは 30 日目でもその変動が

小さかった。

### 【考 察】

これまで我々は、修飾した PrP 遺伝子を導入してプリオン高感受性マウスを確立した。この PrP 特異的な感受性に、さらに相加的に付与できる他の感受性増強効果を探索する必要があると考え、PrP の構造変換やその伝播にマイクロドメインの存在およびその構造が関与すると示唆されていることから、今回の研究ではマイクロドメインに注目した。Ugcg 活性の高発現によりマイクロドメインの構造や機能を修飾できる可能性、さらにその結果として、GPI アンカー型のタンパク質である PrP の構造変換や伝播の過程に影響を与えプリオンに対する感受性を修飾することを期待した。しかしながら、表 1 に示すように、明瞭な傾向や対照群との相違は見られなかった。PrUgcg#1 および#3 マウスでは、大脳および小脳の総膜画分中の Ugcg 酵素活性が野生型マウスに比較して 1.4~2.0 倍上昇していたが、PrP の伝播の過程に影響を及ぼすほどマイクロドメインの構造を変化させるには不十分と考えられた。最近、殆どのガングリオシド（酸性スフィンゴ糖脂質）が合成できない GM3 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスが作製され、繁殖や発生の過程では異常を示すことなく野生型と変わらないが、インスリンに対する感受性が増強していることが判明した。このマウスは、今回のテーマを解明するために検討する価値があると思われる。

PrP<sup>Sc</sup> が検出される臓器、あるいは PrP<sup>Sc</sup> と直接接触する機会がある細胞では、プリオン感染・伝達の初期には特異的な遺伝子の発現が期待できる。そこで、PrP<sup>Sc</sup> を接種したマウスの血液中の細胞（リンパ球やマクロファージ）、および脾臓、脳などでマイクロアレイにより網羅的・包括的に遺伝子の発現を解析し、構造や機能別に比較することでマイクロドメインに特徴的な遺伝子発現の探索を試みた。血液細胞では、意義は不明だが本来からかなり発現している transmembrane 9 superfamily member 2 の発現が 2~30 日の間を通じて高くなる。それに比較して、絞り込める段階では無いが 10 日目の脾臓で活発に遺伝子が発現あるいは抑制されていること、また、脳では遅れて 30 日目（以降）に遺伝子発現が変動し始める点は、個体内で PrP<sup>Sc</sup> が検出される時期の相違を反映しているように思われることから、採材の時期を見直す必要がある。ただ、臨床症状を呈す時期には他の脳変性疾患と共通の遺伝子発現パターンを示す可能性も留意しなければならない。今後、感受性の異なるプリオン株やマウスを用いることで条件を絞り込む予定である。また、PrP を持続的に発現する神経芽細胞腫由来株化細胞 ScN2a 等を利用して試験管内感染を成立させ、均一細胞系でも遺伝子発現パターンを検討する予定である。

### 【結 論】

我々が作製したトランスジェニックマウスは、Ugcg の活性発現が充分でなかったためマイクロドメイン構造を修飾できず、プリオンに対する感受性を変化させることができなかつたと考えられる。また、プリオン感染初期に脾臓および脳でマイクロドメイン関連遺伝子を含め特異的な遺伝子発現プロファイルが存在する可能性が示された。

### 【参考文献】

- 1) Simons K., Ehehalt R.: Cholesterol, lipids rafts, and disease. J Clin Invest. 110: 597-603, 2002
- 2) 三好一郎, 毛利資郎, 岡村匡史, 北本哲之: プリオンタンパク関連遺伝子導入マウスの作製と解析. 厚生労働省特定疾患「プリオン病及び遅発性ウイルス感染に関する調査研究班」, (班長 水澤英洋) 平成 14 年度研究報告書: 92-95, 2003

### 【研究発表】

#### 1. 論文発表

- 1) Gombojav A., Shimauchi I., Horiuchi M., Ishiguro N., Shinagawa M., Kitamoto T., Miyoshi I., Mohri S.,

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

- 2) 三好一郎, 毛利資郎, 笠井憲雪, 北本哲之: ヒトプリオンに高感受性を示す遺伝子改変マウスの開発. *最新医学.* 58: 1026-1034, 2003
2. 学会発表

表 1. PrUgcg マウスのプリオン伝達試験

Mouse	Ugcg expression	Affected/Inoculated	Incubation periods
# 1	1.4	4/4	185±5.2
Littermate	1.0	3/3	198±7.1
# 3	1.6	4/4	212±47.2
Littermate	1.0	4/4	183±2.3

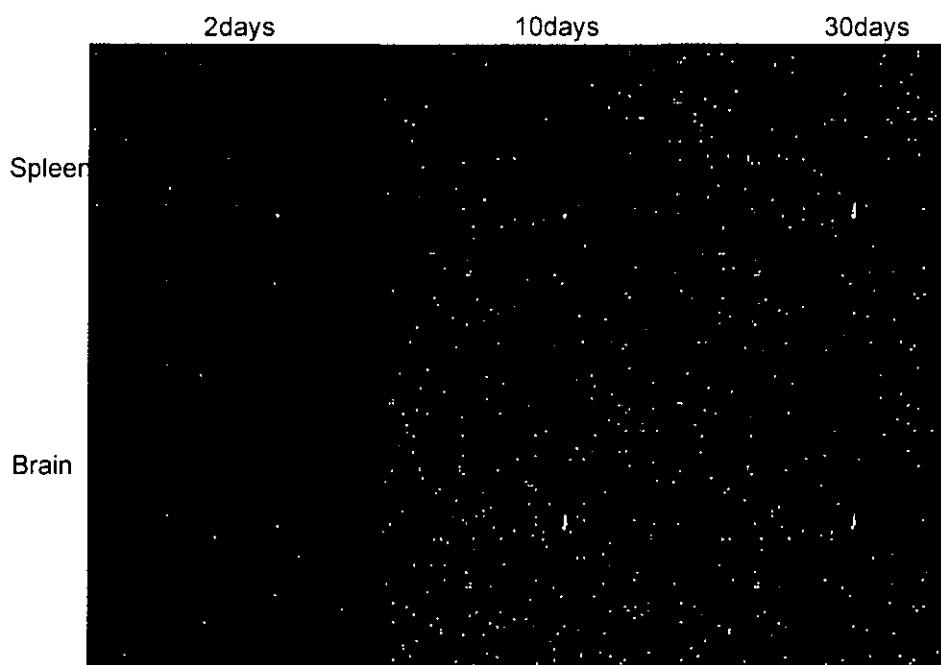


図 1. プリオン接種後のマイクロアレイ解析

表 2. 顕著な変動の見られるマイクロドメイン関連遺伝子

	Gene Symbol	Annotation
Up	Slc6a9**	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 9
	Rab10	RAB10, member RAS oncogene family
	Tle4	transducin-like enhancer of split 4, E(spl) homolog (Drosophila)
	Nt5c3	5'-nucleotidase, cytosolic III
Down	Tbl3***	transducin (beta)-like 3
	Anxa8	annexin A8
	Gpr34	G protein-coupled receptor 34
	Arhu	ras homolog gene family, member U
	Rin2	Ras and Rab interactor 2
	Gabarapl1	gamma-aminobutyric acid (GABA(A)) receptor-associated protein-like 1



表 1. PrUgcg マウスのプリオン伝達試験

Mouse	Ugcg expression	Affected/Inoculated	Incubation periods
# 1	1.4	4/4	185±5.2
Littermate	1.0	3/3	198±7.1
# 3	1.6	4/4	212±47.2
Littermate	1.0	4/4	183±2.3

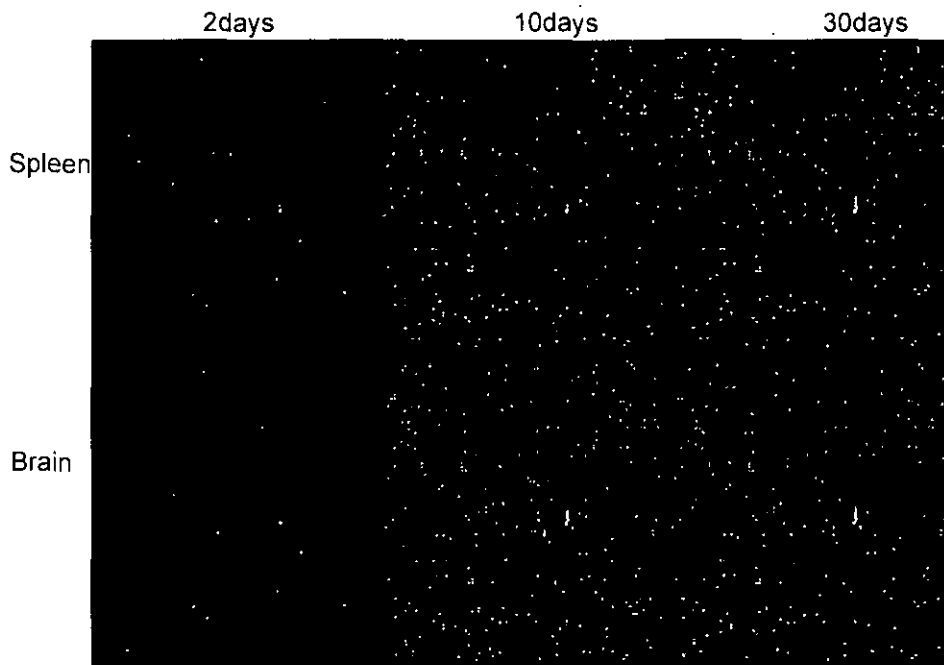


図 1. プリオン接種後のマイクロアレイ解析

表 2. 顕著な変動の見られるマイクロドメイン関連遺伝子

	Gene Symbol	Annotation
Up	Slc6a9**	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 9
	Rab10	RAB10, member RAS oncogene family
	Tle4	transducin-like enhancer of split 4, E(spl) homolog (Drosophila)
	Nt5c3	5'-nucleotidase, cytosolic III
Down	Tbl3***	transducin (beta)-like 3
	Anxa8	annexin A8
	Gpr34	G protein-coupled receptor 34
	Arhu	ras homolog gene family, member U
	Rin2	Ras and Rab interactor 2
	Gabarapl1	gamma-aminobutyric acid (GABA(A)) receptor-associated protein-like 1

# 正常プリオン蛋白質のアポトーシス抑制機能に関する研究

班 員：佐伯 圭一（東京大学・大学院農・応用免疫）  
研究協力者：作道 章一（東京大学・大学院農・応用免疫）  
小野寺 節（東京大学・大学院農・応用免疫）

## [研究要旨]

我々は、これまでにプリオン蛋白質(PrP)の機能解析により PrP は神経細胞の生存維持に関わっていることを明らかにしてきた。本年度は PrP のアポトーシス抑制機能部位について解析検討した。PrP 遺伝子欠損不死化神経細胞株に N 末端のオクタリピート領域欠損 PrP cDNA (PrP $\Delta$ 53-94 cDNA)もしくは疎水性領域欠損 PrP cDNA(PrP $\Delta$ 95-132 cDNA)を導入したところ、PrP cDNA を再導入した細胞株で認められる無血清培地培養下でのアポトーシス抑制が認められなかった。一方、PrP $\Delta$ 124-146 にはアポトーシス抑制効果が確認された。また、PrP 様蛋白質(PrPLP/Dpl)にはアポトーシス抑制効果が認められなかった。PrPLP/Dpl に PrP オクタリピート領域もしくはオクタリピート領域+疎水性領域を融合させた蛋白質 (PrP(1-95)-PrPLP/Dpl および PrP(1-124)-PrPLP/Dpl) を発現するそれぞれのキメラ cDNA を作成し、これらの蛋白質のアポトーシス抑制効果を調べた。その結果、PrP(1-124)-PrPLP/Dpl にはアポトーシス抑制効果が認められたが、PrP(1-95)-PrPLP/Dpl には、アポトーシス抑制効果が観察されなかった。これらの結果から PrP のアポトーシス抑制効果にはオクタリピート領域だけでなく疎水性領域も重要であることが示唆された。

Identification of domains important for anti-apoptotic function of cellular prion protein

Keiichi Saeki, Akikazu Sakudo, Takashi Onodera

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

## ABSTRACT

The author previously demonstrated the anti-apoptotic function of cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) using immortalized prion protein (PrP) gene -deficient neuronal cells. However, the mechanism(s) by which PrP<sup>C</sup> prevents apoptosis remains unclear. PrP<sup>C</sup> contains two evolutionarily conserved domains among mammals; viz., the octapeptide repeat region (OR) and the hydrophobic region (HR). In this study, the author determined the important domains for anti-apoptotic function of PrP<sup>C</sup>. Removal of the OR enhanced apoptosis. Deletion of the HR abolished its ability to prevent apoptosis, whereas that of residues 124-146 of PrP<sup>C</sup> had little if any effect on the anti-apoptotic activity. PrP-like protein (PrPLP/Dpl) or PrPLP/Dpl fused with OR did not prevent apoptosis, whereas PrPLP/Dpl fused with OR + HR suppressed apoptosis. These results suggested that not only OR but also HR is indispensable for the anti-apoptotic function of PrP<sup>C</sup>.

## [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(Ri<sup>kn</sup> マウス)を維持している。このマウスを用いた研究では世界で初めて PrP 遺伝子欠損マウス脳海馬より不死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公表してきた(1, 2)。そして、PrP が抗酸化ストレス活性を高めることにより、アポトーシス抑制に関わること

を報告した(3)。しかしながら、PrP によるアポトーシス抑制機構は十分には明らかになっておらず、特にアポトーシス抑制機構に関わる PrP の領域については十分な研究がされていない。そこで、本年度は PrP 遺伝子欠損不死化神経細胞株における PrP のアポトーシス抑制機能部位について検討した。

## 【目的】

本研究では PrP の機能解析を目的として、PrP 遺伝子ノックアウトマウス海馬由来不死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(1)。しかしながら、PrP のどの領域が細胞死を抑制し回避するのに重要であ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欠損変異 PrP 発現神経細胞株を解析することにより、PrP のアポトーシス抑制機能における機能部位の同定を試みた。

## 【材料と方法】

マウス PrP 欠損神経細胞株(HpL3-4)、PrP 再導入株 HpL3-4-PrP および N 末端のオクタリピート領域欠損 PrP cDNA (PrP $\Delta$ 53-94 cDNA)、疎水性領域欠損 PrP cDNA(PrP $\Delta$ 95-132 cDNA)、PrP $\Delta$ 124-146 cDNA もしくは空ベクターを導入した細胞(それぞれ HpL3-4-#1、HpL3-4-#2、HpL3-4-#3、HpL3-4-EM)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% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。PrP 様蛋白質(Dpl) cDNA、Dpl に PrP オクタリピート領域もしくはオクタリピート領域+疎水性領域を融合させた蛋白質(それぞれ PrP(1-95)-Dpl および PrP(1-124)-Dpl)を発現するそれぞれのキメラ cDNA を導入した細胞(それぞれ、HpL3-4-Dpl、HpL3-4-OcDpl、HpL3-4-OHDpl)も同様の条件で培養した。血清除去は、無血清 DMEM で 3 回洗浄した後に、無血清 DMEM に置換することにより行った。断片化 DNA の定量は Cell death detection enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Roche Molecular Biochemicals)を用いた。

## (倫理面への配慮)

遺伝子組換えを含む遺伝子工学実験は、文部科学省および東京大学の規定に従い承認を得て行った。

## 【結果】

さまざまな領域を欠損させた PrP 発現する細胞の血清除去下でのアポトーシスを定量することで、PrP によるアポトーシス抑制に重要な領域を調べた(図 1)。アポトーシスの定量は、Cell death detection ELISA kit を用い断片化 DNA 量を測定することで行った(図 2)。その結果、疎水性領域欠損 PrP 発現細胞(HpL3-4-#2)は空ベクター導入細胞(HpL3-4-EM)と同等の断片化 DNA 量を示したが、オクタリピート領域欠損 PrP 発現細胞(HpL3-4-#1)は HpL3-4-EM よりも有意に高い断片化 DNA 量を示した。一方、野生型 PrP や PrP( $\Delta$ 124-146)を発現した細胞(それぞれ、HpL3-4-PrP および HpL3-4-#3)は、HpL3-4-EM よりも有意に低い断片化 DNA 量を示した。Dpl 導入細胞(HpL3-4-Dpl)にはアポトーシス抑制効果が認められなかったため、Dpl に PrP オクタリピート領域もしくはオクタリピート領域+疎水性領域を融合させた蛋白質(PrP(1-95)-Dpl および PrP(1-124)-Dpl)を発現するそれぞれのキメラ cDNA を作成し、これらの蛋白質のアポトーシス抑制効果を同様な方法で調べた(図 3、4)。その結果、PrP(1-124)-Dpl にはアポトーシス抑制効果が認められたが、PrP(1-95)-Dpl には、アポトーシス抑制効果が観察されなかった。

## 【考察】

オクタリピート領域や疎水性領域の欠損により、PrP のアポトーシス抑制能は失われた。さらに、Dpl に PrP のオクタリピート領域を融合させた蛋白質では、アポトーシスは抑制されなかったが、Dpl に PrP のオクタリピート領域と疎水性領域の両方を付加した蛋白質はアポトーシス抑制能を保持して

いた。これらのことから、PrP によるアポトーシス抑制能にはオクタリピート領域だけでなく、疎水性領域も重要であることが示唆された。PrP による抗酸化ストレス活性制御が報告されており(3)、オクタリピート領域や疎水性領域が抗酸化ストレス活性制御にどのように関わることで、アポトーシス抑制能を付与するのか、今後の研究が必要である。

#### [結論]

PrP のアポトーシス抑制能には、オクタリピート領域および疎水性領域が必要である。

#### [参考文献]

- 1) Kuwahara C., Takeuchi A.M., 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) Sakudo A., Lee D-C., Saeki K., Matsumoto Y., Itohara S., Onodera T.: Tumor necrosis factor attenuates prion protein-deficient neuronal cell death by increases in anti-apoptotic Bcl-2 family proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310: 725-729, 2003
- 3) Sakudo A., Lee D-C., Saeki K., Nakamura Y., Inoue K., Matsumoto Y., Itohara S., Onodera T.: Impairment of superoxide dismutase activation by N-terminally truncated prion protein (PrP) in PrP-deficient neuronal cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308: 660-667, 2003

#### [研究発表]

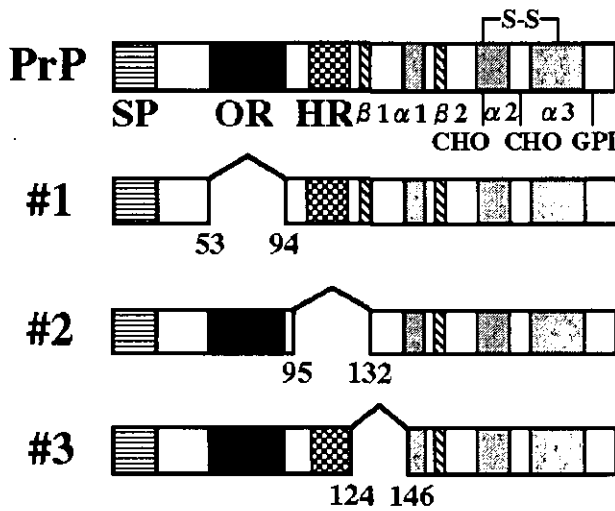
##### 1. 論文発表

- 1) Sakudo A., Lee D-C., Yoshimura E., Nagasaka S., Nitta K., Saeki K., Matsumoto Y., Lehmann S., Itohara S., Sakaguchi S., Onodera T.: Prion protein suppresses perturbation of cellular copper homeostasis under oxidative conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313: 850-855, 2004
- 2) Nakamura Y., Sakudo A., Saeki K., Kaneko T., Matsumoto Y., Toniolo A., Itohara S., Onodera T.: Transfection of prion protein gene suppresses coxsackievirus B3 replication in prion protein gene-deficient cells. *J. Gen. Virol.* 84: 3495-3502, 2003
- 3) Sakudo A., Lee D-C., Saeki K., Matsumoto Y., Itohara S., Onodera T.: Tumor necrosis factor attenuates prion protein-deficient neuronal cell death by increases in anti-apoptotic Bcl-2 family proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310: 725-729, 2003
- 4) Sakudo A., Lee D-C., Saeki K., Nakamura Y., Inoue K., Matsumoto Y., Itohara S., Onodera T. : Impairment of superoxide dismutase activation by N-terminally truncated prion protein (PrP) in PrP-deficient neuronal cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308: 660-667, 2003
- 5) Sakudo A., Hamaishi M., Hosokawa-Kanai T., Tsuchiya, K., Nishimura T., Saeki K., Matsumoto Y., Ueda S., Onodera T.: Absence of superoxide dismutase activity in a soluble isoform of prion protein produce by baculovirus expression system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307: 678-683, 2003
- 6) Kubosaki A., Nishimura-Nasu Y., Nishimura T., Yusa S., Sakudo A., Saeki K., Matsumoto Y., Itohara S., Onodera T.: Expression of normal prion protein (PrP) on T lymphocytes and the effect of copper ion: analysis by wild-type and prion gene-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307: 810-813, 2003
- 7) 佐伯圭一：動物のプリオン病 *最新医学* 58(5): 1008-1013, 2003

##### 2. 学会発表

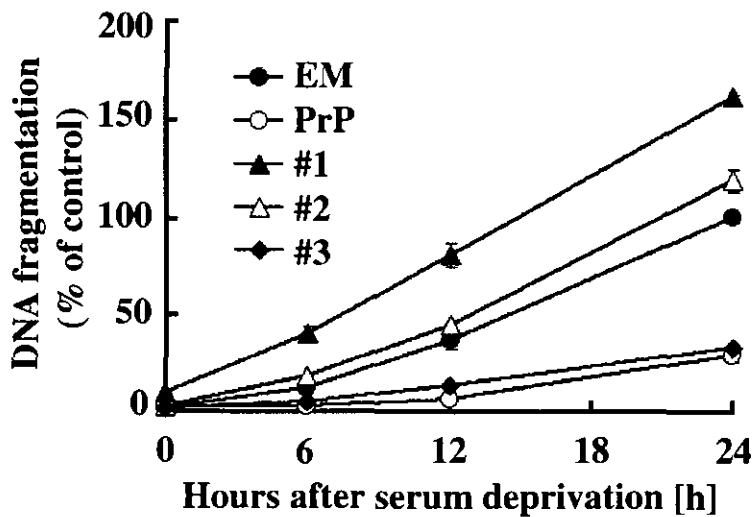
- 1) Sakudo A., Hamaishi M., Hosokawa-Kanai T., Tsuchiya K., Nishimura T., Saeki K., Matsumoto Y., Ueda S., Onodera T.: Purification and characterization of a soluble cellular isoform of prion protein produced by baculovirus expression system. *International PRION conference, munchen, 10 October, 2003*

図1. 欠損変異 PrP の構造



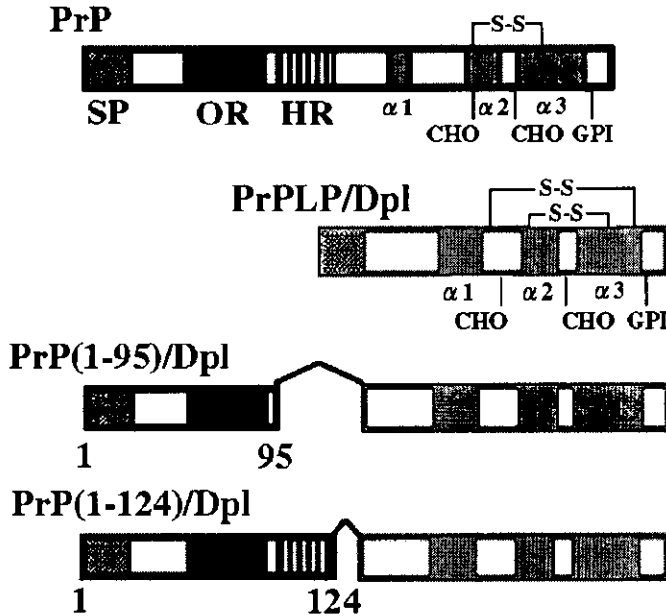
SP: シグナルペプチド, OR: オクタリピート, HR: 疎水性領域, CHO: N型糖鎖, GPI: グリコシル  
 フォスファチジルイノシトール

図2. 欠損変異 PrP 発現細胞の断片化 DNA 量



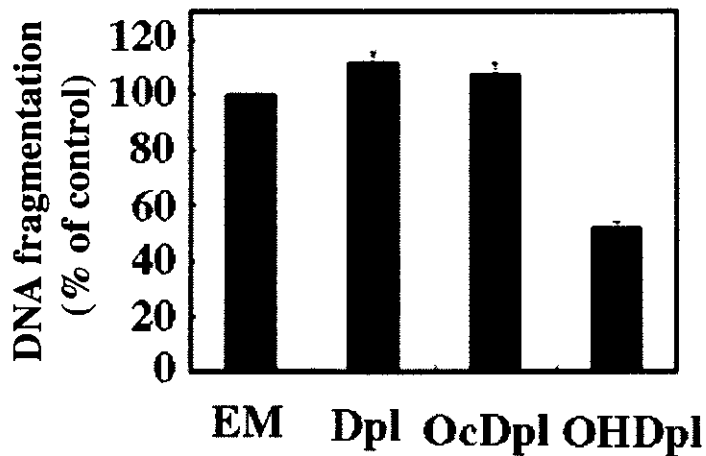
血清除去 0, 6, 12, 18, 24 時間後の欠損変異 PrP 発現細胞の断片化 DNA 量を Cell death detection ELISA により測定した。血清除去 24 時間の HpL3-4-EM 細胞の断片化 DNA 量を 100%とした。  
 EM: HpL3-4-EM (空ベクター導入細胞) ; PrP: HpL3-4-PrP (PrP 再発現細胞) ; #1: HpL3-4-#1 (オクタリピート領域欠損 PrP 発現細胞) ; #2: HpL3-4-#2 (疎水性領域欠損 PrP 発現細胞) ; #3: HpL3-4-#3 (PrP(Δ124-146)発現細胞)

図 3. PrP-Dpl 融合蛋白質



SP: シグナルペプチド, OR: オクタリピード, HR: 疎水性領域, CHO: N 型糖鎖, GPI: グリコシル  
 フォスファチジルイノシトール

図 4. PrP-Dpl 融合蛋白質発現細胞の断片化 DNA 量



血清除去 24 時間後の Dpl 融合蛋白質発現細胞の断片化 DNA 量を Cell death detection ELISA に  
 より測定した。血清除去 24 時間の HpL3-4-EM 細胞の断片化 DNA 量を 100%とした。EM:  
 HpL3-4-EM (空ベクター導入細胞) ; Dpl: HpL3-4-Dpl (Dpl 発現細胞) ; OcDpl: HpL3-4-OcDpl  
 (PrP(1-95)/Dpl 発現細胞) ; OHDpl: HpL3-4-OHDpl (PrP(1-124)/Dpl 発現細胞)

# 変異 PrP によるプリオン株の生物学的性質の解析

班 員：坂口 未廣（長崎大学・大学院医歯薬・感染分子病態）

研究協力者：新 竜一郎（長崎大学・大学院医歯薬・感染分子病態）

西田 教行（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・感染分子病態）

## 〔研究要旨〕

我々は、2種類のマウス順応プリオン株である Chandler 株及び 22L 株の持続感染細胞を用いて、プリオン株の分子生物学的性質の違いを見出すことを試みた。具体的には、異種（ハムスター、ヒト）のプリオン蛋白 (PrP) 及び単一アミノ酸変異を有するマウス PrP を感染細胞に遺伝子導入し、それらの異常型 PrP (PrP<sup>Sc</sup>) への変換とマウス PrP に対する変換抑制効果について検討した。その結果、興味深いことに、Q185R と Q218K マウス変異 PrP は、それぞれの感染細胞にて、異なる変換効率及び抑制効果を示した。この結果は、プリオン株特異的な変換機構が存在することを示唆した。

## Analysis of molecular characteristics of prion strains

Suehiro SAKAGUCHI, Ryuichiro ATARASHI, Noriyuki NISHIDA, Shigeru KATAMINE

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

## ABSTRACT

It has been previously demonstrated that biological characteristics of a prion strain could be preserved even in cultured neuronal N2a58 cells. However, the molecular basis of a prion strain remains unknown. In the present study, to elucidate the mechanism of a strain-specific conversion, we compared the effect of heterologous and mutant prion proteins (PrPs) on the pathogenic conversion of normal PrP (MHM2) in the cells persistently infected with either a Chandler (Ch) or a 22L prion. Most of the transfected PrPs could not be converted into PrP<sup>Sc</sup> in both Ch- and 22L-N2a58 cells. However, Q185R-PrP was efficiently converted into PrP<sup>Sc</sup> in Ch-N2a58 cells only. On the other hand, hamster and human PrPs similarly inhibited the conversion of MHM2-PrP in both Ch- and 22L-N2a58 cells. However, Q218K-PrP prevented the conversion only in Ch-N2a58 cells. These results suggest that a prion could interact with PrP in a strain-specific manner, resulting in the propagation of a prion with strain-specific biological characteristics.

## 〔はじめに〕

プリオン病の病原体“プリオン”には、ウイルスのように、生物学的性質を異にする多くの株が存在する。ウイルスの場合、株の違いはウイルス遺伝子の配列の違いがもたらしている。プリオンでは、異常型プリオン蛋白 (PrP<sup>Sc</sup>)の構造の違いが、プリオン株の性質を規定していると考えられている。しかしその証明も含め、その分子メカニズムは解明されていない。今回我々は、マウス順応プリオン株である Chandler 株と 22L 株にそれぞれ持続感染した細胞の樹立に成功した。そこで我々は、プリオン株の分子機構を解明するために、変異 PrP の PrP<sup>Sc</sup> への変換効率及び PrP<sup>Sc</sup> への変換抑制効果についてこれらの持続感染細胞を用いて比較検討した。

## 〔材料と方法〕

マウス PrP を過剰発現させた N2a 細胞(N2a58)に、マウスプリオン株である Chandler 及び 22L をそれぞれ感染させ、PrP<sup>Sc</sup>を持続的に産生するクローン (Ch-N2a58, 22L-N2a58) を得た。内在性のマウス PrP と遺伝子導入した PrP とを区別するために、マウス PrP を認識しない抗体である 3F4 のエピトープをマウス PrP に導入した MHM2-PrP 発現ベクター (pcDNA3.1 [Invitrogen])を作製した。これらの発現ベクターを、上記の細胞に Effectene (Qiagen)を用いて遺伝子導入した。また、3F4 タグを持つ変異 PrP(Q218K, Q218E, Q97R, Q167R, Q171R, Q185R), ハムスターPrP (SHaPrP), ヒト PrP (HuPrP)発現ベクターも同時に作製した。それぞれの PrP の PrP<sup>Sc</sup> への変換効率を検討する場合は単独で、また変換抑制効果を検討する場合は MHM2-PrP と同時に遺伝子導入した。遺伝子導入 72 時間後、細胞を lysis し、PrP<sup>Sc</sup> を 3F4 による Western Blot により検出した。PrP<sup>Sc</sup>の検出には、細胞 lysate をプロテアーゼ K(ProK)、20µg/ml, 30 分処理した後、約 20,000g, 1 時間遠心後の不溶画分を使用した。

## 〔倫理面への配慮〕

今回行った実験では動物実験は行っていない。

## 〔結果〕

(1) MHM2-PrPは、Ch-と22L-N2a58細胞において、同様にPrP<sup>Sc</sup>へ変換された(図1)。しかし、SHa-PrP, Hu-PrP, Q218E, Q218K, Q97R, Q167R, Q171R-PrPは、両感染細胞におい手全く変換されなかった(図2)。興味深いことに、Q185R-PrPは22L-N2a58細胞ではPrP<sup>Sc</sup>へ変換されなかったが、Chandler感染細胞内ではMHM2-PrPと同程度に変換された(図4)。

(2) Q218K-PrP は、Ch-N2a58 細胞では MHM2-PrP の変換に対して強い抑制を示したが、22L-N2a58 細胞ではその抑制効果は全く認められなかった(図3)。SHa-PrP, Hu-PrP, Q97R-PrP, Q167R-PrP, Q171R-PrP は、両感染細胞において、同様な抑制効果を示した(図3)。

## 〔考察〕



今回我々は、Q185R-PrP の PrP<sup>Sc</sup> へ変換効率が異なるプリオン株に感染した細胞間で異なることを示した。また我々は、Q218K-PrP の変換抑制効果がこれらの異なる感染細胞間において違うことも示した。これらの結果は、感染しているプリオン株によって、PrP の変換過程に株特異的な機構が存在することを示唆した。その分子機構は明らかでないが、protein-only hypothesis が提唱しているように、Chandler 株と 22L 株由来の PrP<sup>Sc</sup> の構造が異なるためであるかもしれない。プリオン株の分子機構のさらなる解明には、それぞれの PrP の無細胞系における変換効率及び抑制効果を検討することが重要であると考えられる。

#### 【結論】

プリオン株により異なった変換、抑制パターンをしめす PrP の変異が存在する。

#### 【参考文献】

- 1) 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 U S A.* 94: 10069-10074, 1997
- 2) Nishida N., Harris DA., Vilette D., Laude H., Frobert Y., Grassi J., Casanova D., Milhavel O., Lehmann S.: Successful transmission of three mouse-adapted scrapie strains to murine neuroblastoma cell lines overexpressing wild-type mouse prion protein. *J Virol.* 74: 320-325, 2000
- 3) Horiuchi M., Priola SA., Chabry J., Caughey B.: Interactions between heterologous forms of prion protein: binding, inhibition of conversion, and species barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 5836-5841, 2000
- 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) 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 13079-13084, 2002

#### 【研究発表】

##### 1. 論文発表

- 1) Sakudo A., Lee D., Yoshimura E., Nagasaka S., Nitta K., Saeki K., Matsumoto Y., Lehmann S., Itohara S., Sakaguchi S., Onodera T.: Prion protein suppresses perturbation of cellular copper homeostasis under oxidative conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 313: 845-850, 2004
- 2) Watarai M., Kim S., Erdenebaatar J., Makino S., Horiuchi M., Shirahata T., Sakaguchi S., Katamine S.: Cellular prion protein promotes *Brucella* infection into macrophages. *Journal of Experimental Medicine.* 198: 5-17, 2003
- 3) 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. *Journal of Biological Chemistry*. 278: 28944-28949, 2003

## 2.学会発表

- 1) Sakaguchi S.: Roles of PrP and PrP-like protein (Doppel) in neurodegeneration. *Molecular Aspects of Transmissible Spongiform Encephalopathies (Prion Diseases)*. Keystone Symposium, Colorado, USA, 2003
- 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学術集会（京都）2003
- 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学術集会（京都）2003
- 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学術集会（京都）2003

## 【知的所有権の取得状況】

特になし

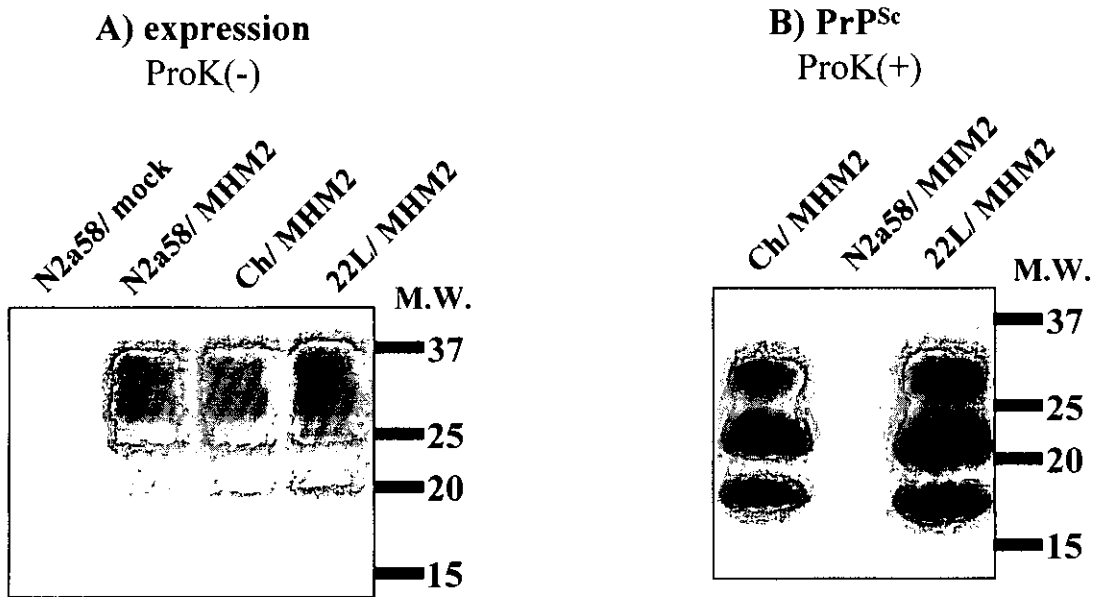
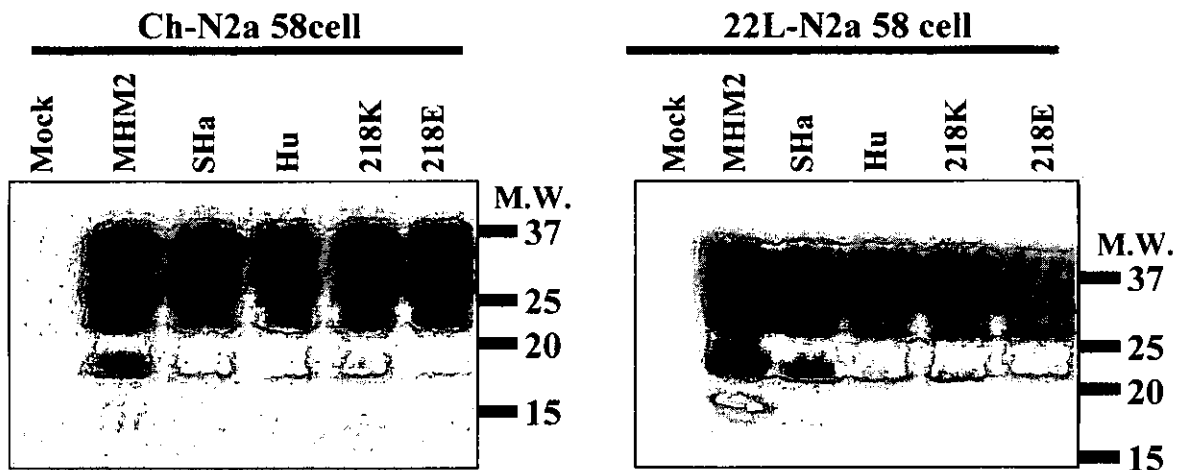


図1：3F4 antibody-tagged mouse PrP (MHM2)は22L-N2a58細胞とCh-N2a58細胞内で同等にPrP<sup>Sc</sup>に変換される

**A) expression ProK(-)**



**B) PrP<sup>Sc</sup> ProK(+)**

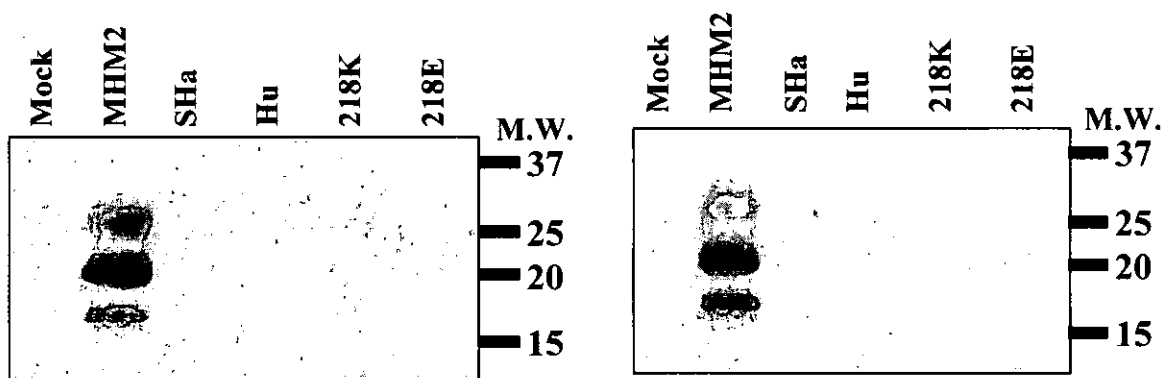
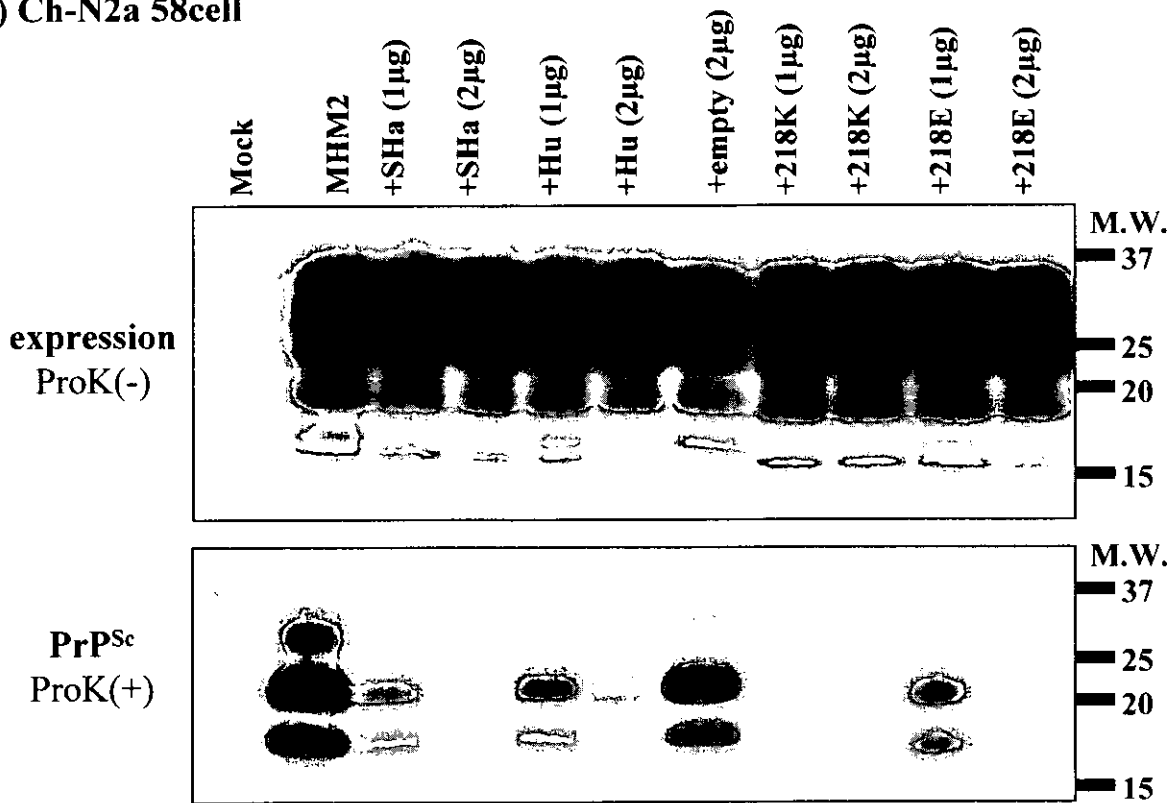


図2：異種PrP (SHa, Hu) あるいは変異PrP (Q218E, Q218K) は22L, Chandlerプリオン株感染細胞両者でPrP<sup>Sc</sup>へ変換されない

A) Ch-N2a 58cell



B) 22L-N2a 58cell

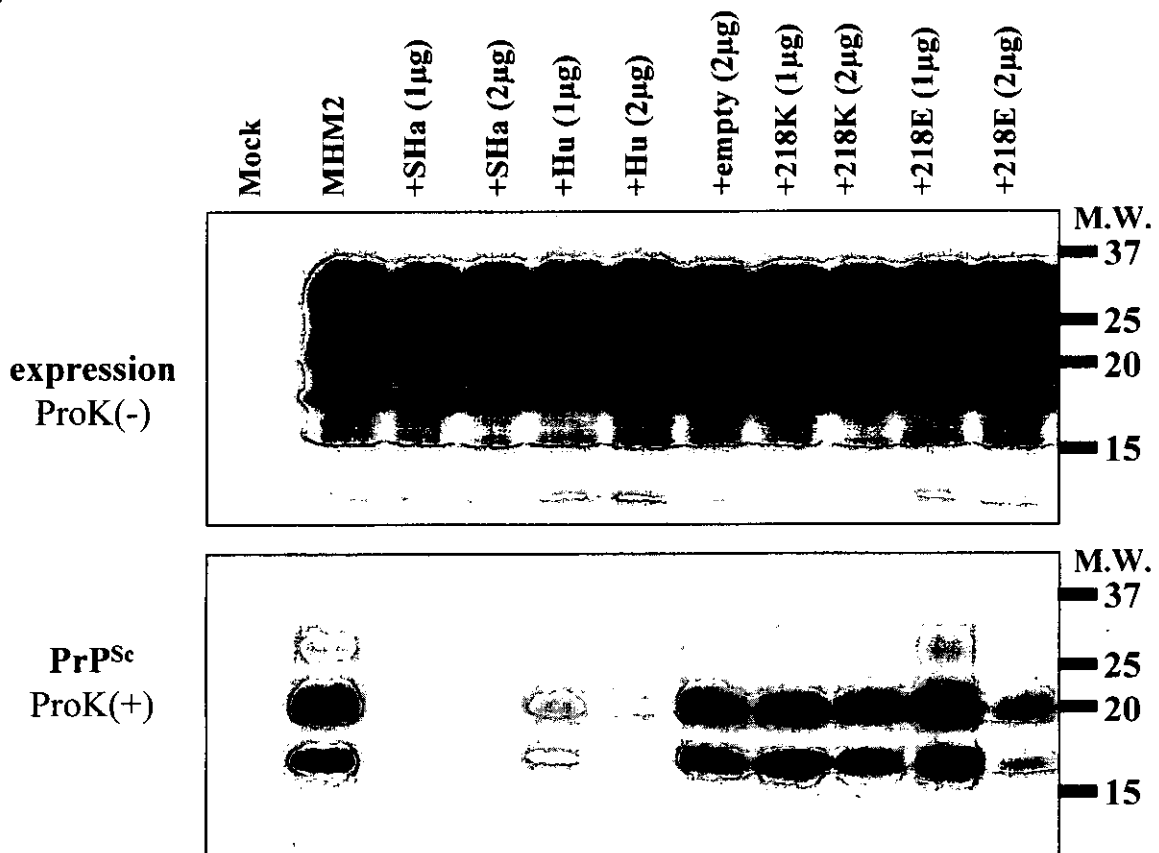


図3 : Q218K PrPはChandler株持続感染細胞では MHM2 PrP<sup>Sc</sup>の変換を強く抑制するが, 22L株持続感染細胞では抑制効果をしめさない