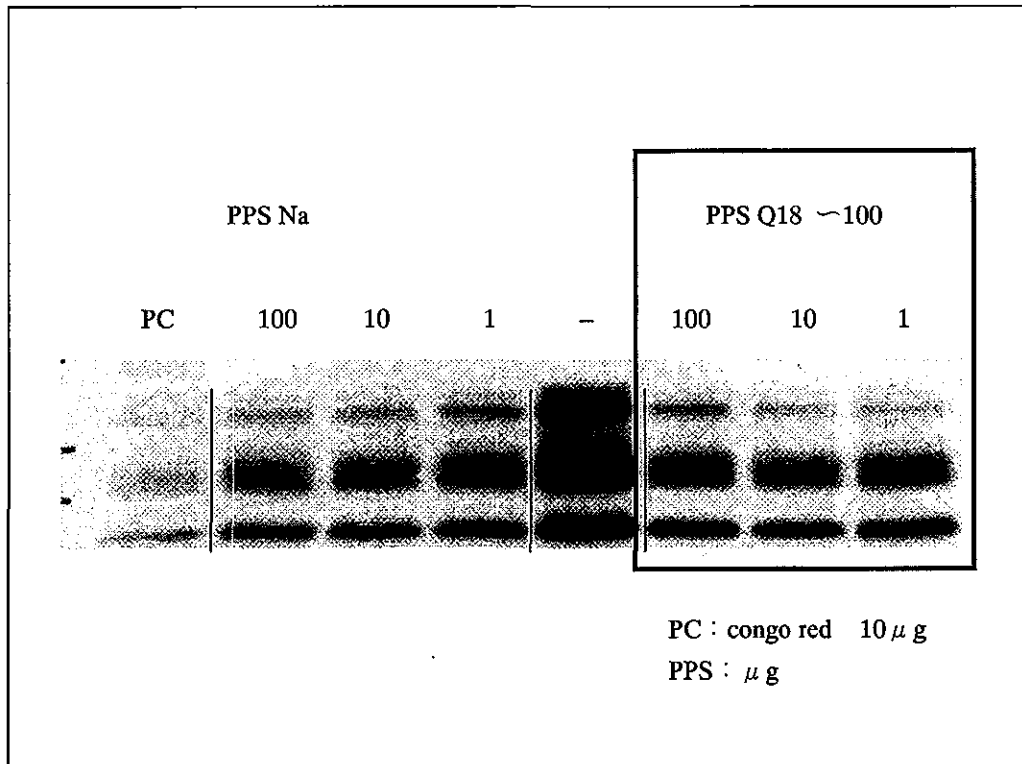


図 2)



低分子分画 PPS は限外濾過法で蛋白分子量 (100KD) を分画するために用いられる膜を使用した。得られた分画を異常プリオン持続感染細胞 (GT22L) の培養上清に添加した後、細胞をプロテイナーゼ K 処理しウエスタンブロット法に供し PrPSc 量を半定量的に検討した。Positive control にはコンゴレッドを用いた。

アミロイド・イメージング化合物のプリオン病診断と治療への応用

分担研究者：堂浦 克美（東北大学・大学院医・プリオン蛋白分子解析）

研究協力者：石川 謙介（東北大学・大学院医・プリオン蛋白分子解析）

工藤 幸司（東北大学・先進医工学研究機構）

【研究要旨】

プリオン病ハイリスク群の発症予防、さらには発症した患者の生命予後改善のためには治療法のみならず早期診断法の開発が急務であり、アミロイド画像化化合物を用いた核医学検査法による異常プリオン蛋白沈着画像化（プリオン・イメージング）を検討した。また、アミロイド結合化合物は抗プリオン作用を持つことが予想されたため、これらの化合物のプリオン病治療薬への応用についても検討した。

コンゴレッドの類似化合物 BSB やチオフラビンの類似化合物 BTA-1、さらに 80 種以上におよぶ置換インデン環化合物についてプリオン・イメージングのスクリーニングを行った。プリオン病モデルマウスへ静脈内投与後に脳切片を作製し解析したところ、これらのプローブ化合物が末梢からの投与でも中枢神経系内に蓄積した斑状の異常プリオン蛋白沈着を *in vivo* で検出した。置換インデン環化合物は脳移行性が極めて良好で変異原性などの毒性が低いものが多く、実用化が期待される。

一方、200 種以上のアミロイド・イメージング化合物について、プリオン持続感染細胞における異常型プリオン蛋白の産生阻害を調べたところ、多数の化合物で極めて低濃度（IC50 が数ナノモルから数十ナノモル）での阻害効果を確認した。いくつかの化合物について、末梢静脈から少数回投与あるいは反復投与を行いモデル動物での治療効果を検討したところ、感染中期以降の治療開始にも関わらず有意な生存期間延長を確認した。これらの化合物は、本来の目的から考えて脳組織への移行が良好であることは勿論のこと、脳組織から迅速に消退するようにデザインされている。したがって、脳組織中であらう少し安定な化合物をデザインできれば、さらにすぐれた治療効果を期待できる。

Application of amyloid imaging probes to diagnosis and treatment of prion diseases

Katsumi DOH-URA

Division of Prion Biology, Department of Prion Research,
Tohoku University Graduate School of Medicine

ABSTRACT

Neuroimaging such as PET using radiolabelled probes have been reported to be informative on neuropathological changes and helpful for the early diagnosis of neurodegenerative disorders. It has been increasingly necessary to develop new diagnostic methods as well as therapeutic interventions for patients suffering from prion diseases, and those at high risk. Here we focused on amyloid imaging probes and applied them to label abnormal deposition of prion protein (PrP). We also examined these probes for application to the therapeutics, since some amyloid binding compounds have anti-prion activities.

Amyloid dyes including BSB and BTA-1, both of which have been reported as probes for beta-amyloids, and novel chemicals of stilbenes were used. Most of them selectively bound to compact PrP plaques, not only in the brain specimens of human prion diseases, but also in the brains of model animals when the probes were injected intravenously. The chemicals of stilbenes seemed most promising because of high brain penetration and low toxicity.

On the other hand, many of these amyloid binding compounds inhibited abnormal PrP formation in a cellular model of prion

disease with IC_{50} values in the nanomolar order. Some of these were administered intravenously and prolonged the incubation period in a mouse model, despite being introduced at a late stage of the infection. Further improvement of in-vivo stability could lead to the novel potent drug for prion diseases, as these probes were essentially designed to show rapid clearance from the brain.

【はじめに】

プリオン病に対してはキナクリンやペントサンポリサルフェートなどの臨床試験が既に行われているが、その治療的な介入は症状出現後の進行した状態から開始されることがしばしばである。プリオン病ハイリスク患者の発症予防、さらに発症した患者の生命予後改善には特異的な早期診断法および治療効果の判定を行う病勢診断法確立が重要である。本研究ではアミロイド画像化プローブを用いた核医学的検査法によるプリオン病病原因子画像化（プリオン・イメージング）開発の基礎研究を行い、一方でいつかのアミロイド結合化合物は抗プリオン作用を持つことが既に知られているため、同化合物のプリオン病予防・治療薬への応用に関する基礎研究（in vitro および in vivo）を行った。

【目的】

アミロイド・イメージング化合物を用いたプリオン・イメージング開発およびプリオン病治療への応用に関する研究を行う。

【材料と方法】

1) ヒトプリオン病（ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病（GSS）2例、散発性クロイツフェルト・ヤコブ病（sCJD）5例、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病（vCJD）1例）の剖検脳および実験モデル動物（263K株罹患 Tg7マウス）脳のホルマリン固定切片を脱パラフィンした後に、アミロイド・イメージング化合物で30分間染色した（50%エタノール溶解液インキュベート、濃度 1-200 μ M）。その後、50%エタノールで分別し蛍光シグナルをコンフォーカル・レーザー顕微鏡で、あるいは放射線シグナルをオートラジオグラムで観察した。

次にモデル動物（1%263K株 20 μ l 脳内接種 6週後の Tg7マウス）の尾静脈よりアミロイド・イメージング化合物溶解液を注入し、一定時間後に安楽死させた。このマウスでは接種後5週頃より脳内に異常なプリオン蛋白沈着が観察され、7週頃に発症が確認される。取り出した脳の凍結切片を作成し、コンフォーカル・レーザー顕微鏡あるいはオートラジオグラムで観察した。いずれのシグナルも同一もしくは連続切片を抗プリオン蛋白抗体による免疫組織化学的検索を行い、異常なプリオン蛋白沈着との一致を検討した。

2) プリオンに持続感染した4系統の培養細胞（ScN2a, F-3, L-1, GT-1-7-22L細胞）を用い、1/10を継代する際の培養上清（OPTI-MEM+10%FBS）中にアミロイド・イメージング化合物を種々の濃度で加えた。コンフルエントとなった細胞を回収し、プロテイナーゼ K 処理や超遠心法などを用いて異常型プリオン蛋白を精製した後、SDS-PAGE および抗プリオン蛋白抗体を用いたウエスタンブロット法により異常型プリオン蛋白の産生阻害効果を検討した。2回以上の実験を繰り返し、化合物が異常型プリオン蛋白の産生を50%阻害する濃度（ IC_{50} ）と細胞増殖に影響を与えない最大濃度（TC）を評価した。また培養細胞にてプリオン阻害活性を認めた化合物の一部については、モデル動物（263K株脳内接種 Tg7マウス、あるいは RML株脳内接種 Tga20マウス）の末梢から投与し（4週間投与型浸透圧ポンプを用いた皮下への投与、尾静脈内あるいは腹腔内への反復投与）、種々の条件で延命効果を検討した。

（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】

脳切片における異常プリオン蛋白沈着の描出

既報のアミロイド・プローブ2種（コンゴーレッド類似化合物 BSB、チオフラビン類似化合物 BTA-1）、および80種類以上の置換インデン環化合物について検討を行った。GSS患者脳切片においては小脳皮質分子層を中心とした異常プリオン

蛋白斑状沈着（クルー斑）に一致した斑状の蛍光シグナルを描出した。そのうち幾つかの化合物は、クルー斑を伴う sCJD 1 症例の脳切片において斑状のシグナルを描出した。他の sCJD の 4 症例では、免疫染色で大脳皮質に認められた瀰漫性微細顆粒状、あるいは空胞周囲性の異常プリオン蛋白沈着に一致するシグナルは観察されなかった。vCJD 患者脳切片では、かなり大型の粗大顆粒状異常プリオン蛋白沈着が描出された。罹患マウス脳切片においては、脳梁・皮質下白質・側脳室周囲に観察された粗大顆粒状の異常プリオン蛋白沈着を描出した。いずれの蛍光染色も、十分な分別・洗浄の後には背景をほとんど染めず、極めて特異的に異常プリオン蛋白が観察された。

一方、置換インデン環化合物 BF-180 について 125I でラベルを行い、剖検脳切片上で溶解液をインキュベートした後に十分洗浄し解析したが、組織への非特異的吸着が強いためにオートラジオグラムではプリオン蛋白沈着に一致した明瞭なイメージ像を得ることはできなかった。

モデル動物における生体内病変の描出

BSB、BTA-1、および脳切片での染色が確認された 6 種の置換インデン環化合物の溶解液（投与量は 0.4-40mg/kg 体重）を感染後期におけるモデル動物の末梢静脈から投与し、脳凍結切片にてマウス生体内の異常プリオン蛋白沈着に一致した蛍光シグナルを観察した。BSB 溶解液を投与した Tg7 マウスでは、注入後 15-18 時間では血管壁などの蛍光シグナルが強く異常プリオン蛋白沈着に一致した蛍光シグナルの識別が困難であったが、その後バックグラウンドのシグナルは消退し、36-42 時間後に観察したものでは、異常プリオン蛋白沈着に一致した蛍光シグナルが明瞭に観察された。一方、置換インデン環化合物はより低濃度で異常プリオン蛋白沈着の検出が可能であり、また投与 8 時間以降は血管壁などの非特異的シグナルはほとんど認められなかった。さらに、標識した置換インデン環化合物については最大投与量として 10mCi を約 1 時間おきに 3 回投与し検討を行った。最終投与から 12 時間後に脳凍結切片を作製しオートラジオグラムで解析したが、脳幹などに非特異的な集積を認め異常なプリオン蛋白沈着に一致した明瞭なイメージ像を得ることはできなかった。

プリオン持続感染細胞におけるプリオン阻害活性

BSB、BTA-1 に加えて既報の β アミロイド・プローブ 2 種 (FDDNP, IMPY)、および約 200 種類の置換インデン環化合物について、培養細胞レベルでの異常型プリオン蛋白の産生阻害効果を検討した。ScN2a 細胞においては 120 種余りの化合物が阻害活性を有し、その IC₅₀ の多くはナノモルオーダーあるいはそれ以下であり極めて低い濃度であった。多くの化合物の TC は 10mM 以上であった。そのうち約 40 種の化合物について、他の感染細胞 (F-3, L-1, GT-1-7-22L 細胞) を用いて同様の検討を行ったが、阻害活性は認められなかった。

モデル動物における治療効果

- a) BSB の 1mg 溶解液を感染中期の 263K 株罹患 Tg7 マウスおよび RML 株罹患 Tga20 マウスの尾静脈から 2 回投与した。その結果、Tg7 マウス群には効果は見られなかったが、Tga20 マウス群で有意な延命効果 (+14%) を認めた。
- b) BF-168 の 0.12mg 溶解液を感染中期の 263K 株罹患 Tg7 マウスおよび RML 株罹患 Tga20 マウスの尾静脈から週 1 回の頻度で反復投与した。その結果、Tg7 マウス群に効果は見られなかったが、Tga20 マウス群で有意な延命効果 (+12%) を認めた。
- c) 3 種の置換インデン環化合物を浸透圧ポンプに充填し、感染中期の RML 株罹患 Tga20 マウスの皮下にポンプを埋設した。その結果、いずれの群でも有意な延命効果は観察されなかった。

[考察]

アミロイド・プローブ候補化合物には、異常プリオン蛋白アミロイドを描出し得るものが多数存在することが明らかとなった。これらは脳移行が良好であること、非特異的吸着が低く粗大顆粒状の異常なプリオン蛋白沈着を認識できることから、臨床への応用が期待される。しかし、いわゆるシナプス型や空胞周囲性の異常なプリオン蛋白沈着を描出することはできなかった。蛍光検出感度の問題を検討するために放射性標識化合物も用いたが、I 標識による物性の変化で組織への非特異的吸着が強くなったため、結論を得るには至らなかった。また、これら化合物は他の神経変性疾患脳で沈着する異常な蛋白アミロイドも描出する可能性があり、疾患特異性という点では今後の検討すべき問題となる。

同時に、これらの化合物の大半がプリオン持続感染培養細胞を用いた実験において、ナノモルオーダーあるいはそれ以下という低濃度で異常型プリオン蛋白の産生を阻害した。これは既報の治療薬候補のうちでも最も低いものに属し、細胞毒性を認めた濃度を考慮すると非常に広く安全な治療域が期待される。その作用機序については本研究の結果から異常なプリオン蛋白凝集と結合することにより新たな異常型プリオン蛋白の産生を阻害することが示唆された。治療への応用を目的とした感染細胞を用いた実験では、ScN2a 細胞にのみ効果が見られたこと、またモデル動物での実験では有意な延命効果はRML株感染マウスにのみ観察されたことから、抗プリオン効果は病原因子株選択的な可能性がある。さらに本来の目的から脳組織から迅速に消退するようにデザインされている置換インデン環化合物は、代謝半減期が短い、このことが限られた効果の一因となっている可能性が残ることから、脳組織中でより安定な化合物の開発は今後の検討すべき課題である。アミロイド・イメージング化合物はプリオン病診断用プローブとしてだけでなく、予防・治療薬のリード化合物としても応用できる。

【結論】

- ・末梢から投与したアミロイド・イメージング化合物は、脳内の異常プリオン蛋白の斑状沈着を描出しえた。vCJDやGSSなどのアミロイド斑を伴うプリオン病の核医学的診断への応用が期待される。
- ・脳移行性が良好であるアミロイド・イメージング化合物に、治療効果も認められ、脳内接種感染の中期以降からの投与でも潜伏期間の延長が観察された。

【参考文献】

- 1) 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, and Doh-ura K: A novel tool for detecting amyloid deposits in systemic amyloidosis in vitro and in vivo. *Lab Invest.* 83(12): 1751-59, 2003
- 2) Murakami-Kubo I, Doh-Ura K, Ishikawa K, Kawatake S, Sasaki K, Kira J, Ohta S, and Iwaki T: Quinoline derivatives are therapeutic candidates for transmissible spongiform encephalopathies. *J Virol.* 78(3): 1281-88, 2004
- 3) Doh-ura K, Ishikawa K, Murakami-Kubo I, Sasaki K, Mohri S, Race R, and Iwaki T: Treatment of Transmissible Spongiform Encephalopathy by Intraventricular Drug Infusion in Animal Models. *J Virol.* 78(10): 4999-5006, 2004

【研究発表】

1.論文発表

- 1) Todd NV, Morrow J, Doh-ura K, Dealler S, O'Hare S, Farling P, Duddy M, Rainov NG: Cerebroventricular infusion of pentosan polysulphate in human variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Infect Dis.* (in press), 2005
- 2) Sasaki K, Doh-Ura K, Wakisaka Y, Tomoda H, Iwaki T: Fatal familial insomnia with an unusual prion protein deposition pattern: an autopsy report with an experimental transmission study. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 31(1):80-7, 2005
- 3) Shiga Y, Miyazawa K, Sato S, Fukushima R, Shibuya S, Sato Y, Konno H, Doh-ura K, Mugikura S, Tamura H, Higano S, Takahashi S, Itoyama Y: Diffusion-weighted MRI abnormalities as an early diagnostic marker for Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology.* 63(3):443-9, 2004
- 4) Furukawa H, Doh-ura K, Sasaki K, Iwaki T: Accumulation of prion protein in muscle fibers of experimental chloroquine myopathy: in vivo model for deposition of prion protein in non-neuronal tissues. *Lab Invest.* 84(7):828-35, 2004
- 5) Ishikawa K, Doh-ura K, Kudo Y, Nishida N, Murakami-Kubo I, Ando Y, Sawada T, Iwaki T: Amyloid imaging probes are useful for detection of prion plaques and treatment of transmissible spongiform encephalopathies. *J Gen Virol.* 85(Pt 6):1785-90, 2004
- 6) 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.* 78(10):4999-5006, 2004
- 7) 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.* 279(22):23661-7, 2004
- 8) Jin K, Shiga Y, Shibuya S, Chida K, Sato Y, Konno H, Doh-ura K, Kitamoto T, Itoyama Y: Clinical features of Creutzfeldt-Jakob

- disease with V180I mutation. *Neurology*. 62(3):502-5, 2004
- 9) 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(3):1281-8, 2004
- 10) 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(1):63-6, 2004
- 11) Doh-ura K: Prion diseases: disease diversity and therapeutics. *Rinsho Shinkeigaku*. 44(11):855-6, 2004, Japanese

2.学会発表

- 1) 堂浦克美：プリオン病治療法の開発。第7回生命化学研究会シンポジウム、仙台、2005年1月21日
- 2) 堂浦克美：アミロイド結合化合物のプリオン病診断・治療への応用。第2回東北アミロイド研究会、仙台、2004年12月17日
- 3) Tsuboi Y, Fujiki F, Yamauchi A, Doh-ura K, Kataoka Y, Yamada T: Treatment with Anti-malaria Agents, Quinacrine and Quinine, for Creutzfeldt-Jakob disease patients. International Symposium of Prion Diseases -food and drug safety-, Sendai, Oct.31-Nov.2, 2004
- 4) Ishikawa K, Kudo Y, Doh-ura K: Inhibition of abnormal PrP formation by amyloid-imaging probes in vitro. International Symposium of Prion Diseases -food and drug safety-, Sendai, Oct.31-Nov.2, 2004
- 5) Miyamoto T, Sadatomi R, Tanaka H, Higuchi R, Kawatake S, Doh-ura K: Can Forage Grasses inhibit Prion Replication? International Symposium of Prion Diseases -food and drug safety-, Sendai, Oct.31-Nov.2, 2004
- 6) 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. International Symposium of Prion Diseases -food and drug safety-, Sendai, Oct.31-Nov.2, 2004
- 7) Sasaki K, Doh-ura K, Iwaki T: New pretreatment method for immunohistochemistry for abnormal prion protein. International Symposium of Prion Diseases -food and drug safety-, Sendai, Oct.31-Nov.2, 2004
- 8) 堂浦克美：治療開発の現状と展望。市民講座「ヤコブ病の対策の現状と克服へ向けての歩み」、仙台、2004年10月31日
- 9) 堂浦克美：プリオン病：遺伝子異常と臨床像・病理像及び治療薬開発の展望。第45回日本神経学会総会、東京、2004年5月13日

[知的所有権の取得状況]

竹中繁織, 野島高彦, 大塚圭一, 堂浦克美：異常プリオンの電気化学的検出方法。特願2004-287562、2004年9月30日
横田博, 堂浦克美：体外診断キット及び体外診断方法。特願2004-216510、2004年7月23日

人工合成硫酸化配糖体による PrP^{Sc} の産生抑制

班 員：堀内 基広（北海道大学・大学院獣医・プリオン病）

研究協力者：山口 聡子（帯広畜産大学・獣医公衆衛生）

【研究要旨】

硫酸ペントサン(PPS)や硫酸デキストラン(DS)、ヘパリンなどの硫酸化グリコサミノグリカン(GAGs)およびその類似体が、プリオン感染細胞において異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の産生を抑制すること、およびスクレイピー感染動物の潜伏期を延長することが報告がされている。硫酸化 GAGs ではすべての硫酸化部位が硫酸化されているのではなく、可能性のある部位がランダムに硫酸化されている。この性質は PrP^{Sc} 産生抑制に関係する GAGs 構造の解明の障壁となっている。本研究では GAGs の PrP^{Sc} 産生抑制に関する構造活性相関を解明する一助として、選択的に様々な位置を硫酸化した配糖体およびそのポリマーの PrP^{Sc} 産生抑制効果をプリオン感染細胞を用いて調べた。使用した配糖体のうち、単量体の 4-sulfo-N-acetyl-glucosamine (4SGN)、ポリマー化した 4SGN、ポリマー化した 6-sulfo-N-glucosamine (6SGN)が 20 μ g/ml 以下の ED₅₀ で PrP^{Sc} 産生を抑制した。配糖体の PrP^{Sc} 産生抑制効果は長期間処理によりさらに明白となった。これらの化合物は細胞の正常型プリオン蛋白質の発現を減少させたが細胞の発育には影響しなかった。構造比較により、2 位に N-アセチル基と、4 位もしくは 6 位に硫酸基を同時にもつことが、PrP^{Sc} 産生の抑制に関係することが示された。また、6SGN では一から三糖では抑制効果が見られず、ポリマーで抑制効果が見られたことから、6SGN の場合は多量体の形状が必要であることが示された。以上の結果は、人工的に硫酸化した配糖体およびそのポリマーは GAGs の構造活性相関の解析に加え、プリオン病治療薬の開発にも役立つことを示すものである。

Inhibition of PrP^{Sc} formation by artificially sulfated glycosides and their polymers

Motohiro HORIUCHI¹, Satoko YAMAGUCHI²

¹Laboratory of Prion Diseases, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, ²Laboratory of Veterinary Public Health, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

ABSTRACT

Sulfated glycosaminoglycans (GAGs) and their analogues such as pentosan polysulfate (PPS), dextran sulfate (DS), and heparin inhibit abnormal isoform of prion protein (PrP^{Sc}) formation in prion-infected cells and prolong the incubation time of scrapie-infected animals. Sulfation of GAGs is not completely regulated and possible sulfation sites are randomly sulfated. This property impedes an elucidation of fundamental structures of GAGs that are involved in the inhibitory effect on PrP^{Sc} formation. To address the structure-activity relationship of Heparin in the inhibition of PrP^{Sc} formation, I screened various regio-selectively sulfated glycosides and their polymers for the inhibition of PrP^{Sc} formation in prion-infected cells. Among the glycosides and their copolymers examined, monomeric 4-sulfo-N-acetyl-glucosamine (4SGN), and two copolymers, poly-4SGN and poly-6-sulfo-N-acetyl-glucosamine (6SGN), inhibited PrP^{Sc} formation with 50% effective dose lower than 20 μ g/ml. The inhibitory effect became more evident in consecutive treatment. They reduced the expression of cellular prion protein but did not affect cell growth. Structural comparison

suggested that coincidence of N-acetyl group at C-2 with sulfate group at C-4 or C-6 might be involved in the inhibition of PrP^{Sc} formation. However, neither monomeric nor dimeric 6SGN, but poly-6SGN showed the inhibitory effect, suggesting the importance of polyvalent configuration in anti-prion effect of 6SGN. These results indicate that the artificially sulfated glycosides and their polymers are useful not only for the analysis of structure-activity relationship of GAGs but also for the improvement of new therapeutic compounds for prion diseases.

【はじめに】

硫酸ペントサン (PPS)、硫酸デキストラン(DS)、ヘパリンなどの硫酸化グリコサミノグリカン(GAGs) およびその類似体が、プリオン感染細胞において異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の産生を抑制すること、およびスクレイピー感染動物の潜伏期を延長することが報告がされている(1-4)。また、PPS はプリオン実験感染マウスモデルでは、プリオン感染中期に PPS を脳室内持続投与した場合でも、ある程度の延命効果があることが報告されている(5)。GAGs はプリオン治療薬の候補と考えられ、実際に臨床試験が進められている。PrP^{Sc} 産生抑制活性に関与する GAGs の基本構造を明らかにすることで、その構造をリードとして、様々な修飾を加え、より活性の高い、あるいは安定な GAG 類似薬が合成可能となる。しかし GAGs は硫酸化部位がランダムに硫酸化されているために、天然型の GAGs で、詳細な構造-活性相関を調べることは難しい。

【目的】

硫酸多糖体である PPS などの GAGs はプリオン病治療薬の候補の一つである。しかし PrP^{Sc} 産生抑制効果と GAG の構造との関連性は不明である。そこで本研究では、硫酸基あるいはその他の官能基の付加と、PrP^{Sc} 増殖抑制効果の関係について明らかにすることを目的として、部位特異的に硫酸基を導入した合成硫酸配糖体とそのポリマーが PrP^{Sc} 産生に及ぼす影響を調べた。

【材料と方法】

硫酸化糖構成要素のアナログとして 6-sulfo-GlcNAc(6SGN)、4-sulfo-GlcNAc(4SGN)、3-sulfo-GlcNAc、6-sulfo-Gal(6SGal)、6-sulfo-Glc(6SGlc)、GlcNAc(GN)の 6 種類の単糖およびポリマーを供試した。また、3,6-sulfo-GalNAc(3,6SGalNAc)などの単糖 8 種、6SGN-6SGN などの 2 糖 5 種も供試した。これらの硫酸化糖アナログは名古屋大学大学院工学研究科西田博士、および産業技術総合研究所鶴沢博士より分与頂いた。I3/I5 プリオン持続感染細胞を 1:10 の割合で継代し、1 日後に被検物質を加えた培地に交換し 2 日間培養した。既報に従い proteinase K 抵抗性 PrP^{Sc} 画分を調整した(6)。PrP^{Sc} はウェスタンブロット(WB)法により検出した。LAS-3000 化学発光検出装置によりバンドの定量解析を行った。被検物質の PrP^{Sc} 発現に対する影響は、WB 法、蛍光抗体法およびフローサイトメトリー (FACS) により調べた。細胞増殖および細胞毒性に対する影響は、WST 法および LDH アッセイにより調べた。

【倫理面への配慮】

プリオン持続感染細胞の取扱は、クラス II 安全キャビネット内で実施した。また、使用した器具類は 135℃、30 分高圧蒸気滅菌処理した。

【結果】

各種硫酸化配糖体を 1、10、100 μ g/ml の濃度で 48 時間処理した。その結果、ポリマー(poly-)4SGN および poly-6SGN は IC₅₀ が 3、9 μ g/ml で PrP^{Sc} の産生を阻害した。また、モノマー(mono-)4SGN も PrP^{Sc} 産生阻害効果を示し、その IC₅₀ は 10 μ g/ml であった(図 1)。PrP^{Sc} の産生を抑制することが知られている DS500 および PPS は、同条件下で IC₅₀ が 0.5 および 0.3 μ g/ml であった。6SGlc

および GN はモノマー、ポリマーのいずれの形状でも PrP^{Sc} の産生を抑制しなかった。また、6SGN-6SGN、6SGN-GN、GN-6SGN-GN などの二あるいは三糖も PrP^{Sc} の産生を抑制しなかった。Poly-4SGN、poly-6SGN、および mono-4SGN を長期間(最長 9 日間)処理すると、PrP^{Sc} は検出限界以下になった(結果は示さず)。PrP^{Sc} 産生抑制効果を示した配糖体は、細胞全体の PrP^C 量を未処理細胞の 50%程度に減少させた(図 2)。また、FACS 解析により、これらの硫酸化配糖体は細胞膜上の PrP^C 発現量も 20%程度減少させることが判明した(結果は示さず)。WST 法および LDH アッセイでは顕著な細胞増殖抑制や毒性は認められなかった。

【考察】

6SGN が PrP^{Sc} 産生抑制効果を有するが、6SGlc, 6SGal, GN が顕著な抑制効果を示さないことから、GN の 2 位の N-アセチル基と 6 位の硫酸基の両方の存在が PrP^{Sc} 産生抑制と関連することが示唆された。また、6SGN は単糖、二糖、三糖では抑制効果を発揮しないことから、オリゴマーの形状も抑制効果と関連すると考えられる。ヘパリンはプリオン持続感染細胞における PrP^{Sc} 産生を抑制することが報告されている(1,7)。ヘパリンはウロン酸と GN の二糖を基本構造とした GAGs であり、GN の 2 位の N-アセチル基、3 および 6 位の水酸基が硫酸化を受ける。2 位の N-アセチル基と 6 位の硫酸基の共存が PrP^{Sc} 産生抑制活性と関連するという結果は、ヘパリン構造活性相関を考える上でも非常に興味深い知見である。また、単糖でも PrP^{Sc} 産生抑制活性を示す硫酸化糖の存在は、これらを基本骨格とした低分子プリオン病治療薬の開発に新たな可能性を提供するものと考えられる。

【結論】

Poly-4SGN、poly-6SGN、および mono-4SGN が、IC₅₀ が 3、9、および 10 μg/ml で PrP^{Sc} の産生を阻害した。6SGN が阻害効果を発揮するには、オリゴマーであることが必要であり、2 位の N-アセチル基および 6 位の硫酸基の両方が存在することが、抑制効果と関連すると考えられた。また、mono-4SGN のように単糖でも PrP^{Sc} 産生抑制効果をもつ硫酸化配糖体の存在を見出した。

【参考文献】

- 1) Caughey, B. and Raymond, G.J.: Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells. *J Virol.* 67: 643-650, 2003
- 2) Ehlers, B. and Diringer, H.: Dextran sulphate 500 delays and prevents mouse scrapie by impairment of agent replication in spleen. *J Gen Virol.* 65: 1325-1330, 1986
- 3) Farquhar, C.F. and Dickinson, A.G.: Prolongation of scrapie incubation period by an injection of dextran sulphate 500 within the month before or after infection. *J Gen Virol.* 67, 463-473, 1986
- 4) Adjou, K.T., Simoneau, S., Sales, N., Lamoury, F., Dormont, D., Papy-Garcia, D., Barritault, D., Deslys, J.P. and Lasmezas, C.I.: A novel generation of heparan sulfate mimetics for the treatment of prion diseases. *J Gen Virol.* 84: 2595-2603, 2003
- 5) Doh-ura, K., Ishikawa, K., Murakami-Kubo, I., Sasaki, K., Mohri, S., Race, R. and Iwaki, T.: Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models. *J Virol.* 78: 4999-5006, 2003
- 6) Kim, CL., Karino, A., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Sato, M. and Horiuchi, M.: Cell-surface retention of PrP^C by anti-PrP antibody prevents protease-resistant PrP formation. *J Gen Virol.* 85: 3473-3482, 2004
- 7) Gabizon, R., Meiner, Z., Halimi, M. and Ben-Sasson, S.A.: Heparin-like molecules bind differentially to prion-proteins and change their intracellular metabolic fate. *J Cell Physiol.* 157: 319-325, 2003

【研究発表】

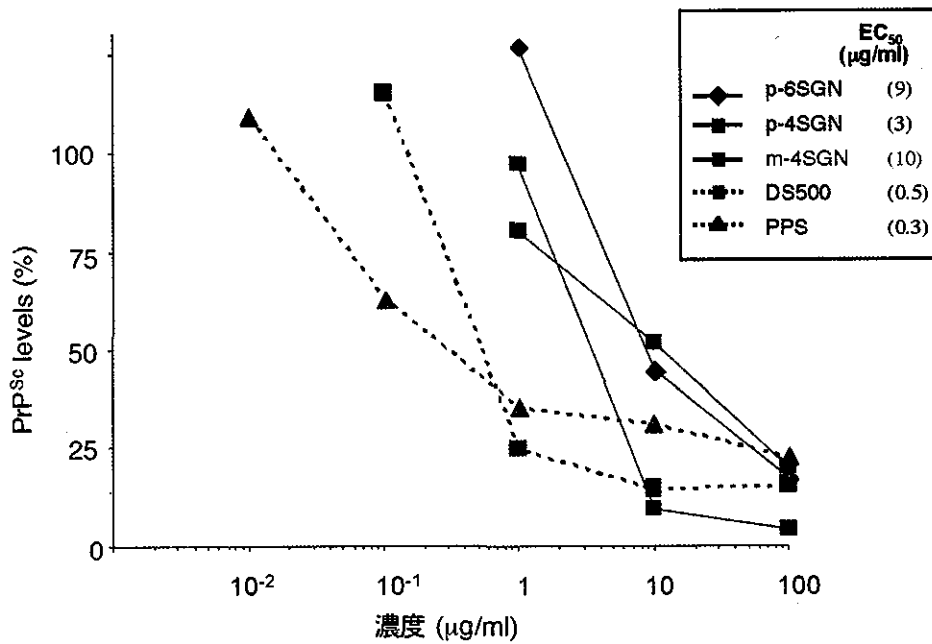
1.論文発表

- 1) 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
- 2) Kim, C-L., Karino, A., Ishiguro, N., Shinagawa, M., and Horiuchi, M.: Cell surface retention of PrP^C by anti-PrP antibody prevents protease-resistant PrP formation. *J. Gen. Virol.* 85: 3473-3482, 2004
- 3) Gombojav, A., Ishiguro, N., Horiuchi, M., and Shinagawa, M.: Unique amino acid polymorphisms of PrP genes in Mongolian sheep breeds. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 1293-1295, 2004
- 4) Furuoka, H., Yabuzoe, A., Horiuchi, M., Tagawa, Y., Yokoyama, T., Yamakawa, Y., Shinagawa, M., and Sata, T.: Effective antigen-retrieval method for immunohistochemical detection of abnormal isoform of prion proteins in animals. *Acta Neuropathol.* (in press).

2.学会発表

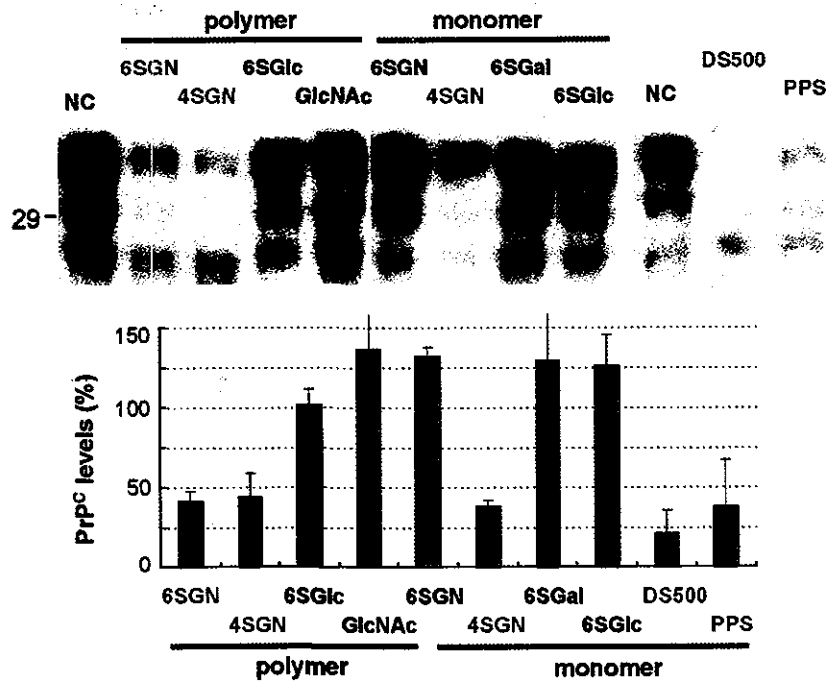
- 1) 金チャンラン、堀内 基広: 抗 PrP 抗体による培養細胞レベルでの PrP^{Sc} 産生抑制機構の解析 第 52 回日本ウイルス学会(2004, 11/21-23、横浜)
- 2) 山口 聡子、宮澤 孝幸、堀内 基広: 人工合成硫酸化糖アナログによる PrP^{Sc} 産生抑制 第 52 回日本ウイルス学会(2004, 11/21-23、横浜)
- 3) Horiuchi, M.: Inhibition of protease-resistant prion protein (PrP) formation by anti-PrP antibodies, The 7th Joint Symposium between Hokkaido University Graduate School of Veterinary Medicine & Seoul University College of Veterinary Medicine, The 6th COE International Symposium for Zoonosis Control (2004, 7/8, Sapporo)
- 4) Horiuchi, M., Tamura, Y., and Furuoka, H.: Comparative analyses of three mouse-adapted scrapie strains G1, Obihiro, and I3/I5 and pathogenesis of G1 strain-induced polyuria in ICR mice. International Symposium Prion Disease Food and Drug Safety (2004, 10/31-11/2, Sendai, Japan)
- 5) Horiuchi, M., Kim, C.-L., Ogino, M., Furuoka, H., and Shinagawa, M.: Cell surface retention of PrP^C by anti-PrP antibody prevents protease-resistant PrP formation. International Symposium Prion Disease Food and Drug Safety (2004, 10/31-11/2, Sendai, Japan)
- 6) Motohiro Horiuchi BSE screening in Japan, The animal prion disease and TSE (2004, 10/14-16, Ames, USA)

図1. 合成硫酸化配糖体によるPrP^{Sc}産生抑制



供試した配糖体のうち、顕著な抑制効果が認められたp-6SGN, p-4SGN, およびm-4SGNのPrP^{Sc}産生抑制効果を示した。未処理細胞におけるPrP^{Sc}を100%とし、相対値を示した。陽性対照としてDS500およびPPSの効果もグラフに示した。3回以上実験を実施し、平均値をプロットした。

図2. 合成硫酸化配糖体がPrP^Cの発現におよぼす影響



上のパネルはウエスタンブロットによるPrP^Cの検出の代表例。下のグラフは、未処理を100%としたときの相対値を示した。同様の実験を3回以上行い、平均値と標準偏差をグラフ化した。

プリオン蛋白質関連神経細胞死抑制および細胞分化に関する研究

班 員：佐伯 圭一（東京大学・大学院農・応用免疫）
研究協力者：西村 拓也（東京大学・大学院農・応用免疫）
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。プリオン蛋白質(PrP)の機能としては、アポトーシス抑制に関係していることが明らかにされつつある。本研究ではこれまで老齢に伴う行動異常を引き起こす系統の PrP 遺伝子(*Prnp*)欠損マウス(Rikn)より樹立した不死化神経細胞株(HpL3-4)を用いて研究を行ってきた。しかし、近年行動異常と PrP 様蛋白 Dpl の発現が PrP の機能を解析していく上で問題視されるようになった。そこで、新たに老齢に伴う行動異常を引き起こさない系統の *Prnp* 欠損マウス(ZrchI)より新たに不死化細胞株を樹立し、PrP の機能についてアポトーシス抑制能および神経分化能について解析を行なった。作製した神経様細胞(Np12)およびグリア様細胞(Gp11)において、血清除去培養条件において PrP 再発現によるアポトーシス抑制が認められた。一方で、Dpl 蛋白再発現によるアポトーシス抑制は認められなかった。Np12 細胞において PrP 欠損細胞と比較して PrP 再発現細胞は、有意に強い突起の形成能(長さ、数)を示した。また PrP 遺伝子導入に伴い、細胞内の活性型 PKA の量の増加が観察された。以上の結果から、PrP は Np12 および Gp11 両細胞においてアポトーシス抑制的に働くことが示された。また、Dpl 蛋白はアポトーシス抑制には関与していないと考えられた。Np12 細胞において PrP は神経突起形成を促進させることが明らかとなった。

Prion protein related anti-apoptosis and cell differentiation in neuronal cells

Keiichi Saeki, Takuya Nishimura, Akikazu Sakudo, Takashi Onodera

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

ABSTRACT

Previous studies have reported a neuroprotective role for cellular prion protein (PrP^C) against apoptosis induced by serum deprivation in an immortalized prion protein gene deficient neuronal cell line. These cell lines were derived from Rikn-type prion protein gene-deficient (*Prnp*^{-/-}) (type-2) mice, which produce a prion protein (PrP)-like glycoprotein named as doppel protein (Dpl). To conclude that PrP^C inhibits apoptosis without Dpl, several immortalized cell lines were established from the brain of type-1 *Prnp*^{-/-} mice (Zrch I). The data showed that PrP^C had anti-apoptotic function in both neuronal and glial cells under serum free condition. On the other hand, the *Prnp*^{-/-} cells expressed Dpl showed apoptosis as with *Prnp*^{-/-} cells. The results suggest that the functions of PrP involve anti-apoptotic effect without reference to ectopic production of Dpl. Also to investigate whether PrP production effect neurite outgrowth of neuronal cell *in vitro*, the extension of the neurite was measured with time after passage. The PrP^C expressed cells showed longer neurite outgrowth than that of *Prnp*^{-/-} cells. The data suggest that PrP^C affects the subsequent growth of neurite.

【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世界で初めて 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、本年度は新たに老齢に伴う行動異常を引き起こさない系統の Prnp 欠損マウス(ZrchI)より新たに不活化神経細胞株を樹立し、PrP の機能についてアポトーシス抑制能および神経分化能について解析を行なった。

【目的】

PrP 欠損神経細胞株は、無血清培地下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)。本研究ではこれまで老齢に伴う行動異常を引き起こす系統の PrP 遺伝子(Prnp)欠損マウス(Rikn)より樹立した不活化神経細胞株(HpL3-4)を用いて研究を行ってきた。しかし、近年行動異常と PrP 様蛋白 Dpl の発現が PrP の機能を解析していく上で問題視されるようになった。そこで、新たに老齢に伴う行動異常を引き起こさない系統の Prnp 欠損マウス(ZrchI)より新たに不活化細胞株を樹立し、PrP の機能についてアポトーシス抑制能および神経分化能について注目し解析を行なった。

【材料と方法】

レトロウイルスベクターを用い、SV40largeT 抗原を ZrchI PrP 遺伝子欠損マウス由来の標的細胞に導入する方法により、細胞の不活化を行ない、限界希釈法によるクローニングを経て Dpl 蛋白非発現型である PrP 欠損不活化神経細胞株 Np12 (MAP-2 陽性、NF 陽性、GFAP 陰性)およびグリア細胞株 Gp11 (GFAP 陽性、MAP-2 陰性、NF 陰性)を樹立した。これらの細胞(Np12 および Gp11)に PrP 遺伝子発現ベクター(pMSCV-PrP-EGFPpuro)及びコントロールベクター (pMSCV-EGFP-puro) を組み換えレトロウイルスを用いて導入し、薬剤選択を行なった後に、それぞれ PrP 再発現細胞 Np12-PrP-EGFP および Gp11-PrP-EGFP、また PrP 非発現細胞 Np12-EGFP および Gp11-EGFP を得た。アポトーシス誘導には血清を含まない培地下での培養を行なった。アポトーシス誘導時における DNA 断片化およびアポトーシス関連因子(p53, Bax, Bcl-xL, Caspase-9, Caspase-3)の発現を PrP 非発現および再発現細胞について比較した。PrP 非発現および再発現神経細胞の分化能については神経様突起の伸長を指標に行なった。これらの細胞を経代後、3 時間および 24 時間目の突起の長さを測定し、比較した。また PKA シグナル伝達経路への関与を調べるため、それぞれの細胞を回収し細胞内の活性型 PKA を測定、比較した。

(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】

これまで用いてきた HpL3-4 で見られた PrP 再発現化に伴うアポトーシス抑制が、新たに樹立した細胞株 Np12(図 1)および Gp11 でも認められた。Dpl 蛋白はアポトーシス抑制を示さなかった。Np12 細胞を用いたアポトーシス誘導実験によりアポトーシス関連因子の発現において、p53, Bax, Bcl-xL 蛋白は PrP 非発現および再発現細胞間で目立った変化はなかったが、活性型 Caspase-9 および Caspase-3 の産生が PrP 再発現細胞ではアポトーシス誘導時抑制されていた(図 2)。Np12 細胞経代後の細胞の形態変化において、PrP 非発現 Np12 と比較して PrP 再発現 Np12 の方が突起の形成能(長さ、数)の亢進が認められた(図 3)。また PrP 再発現に伴い、細胞内の活性型 PKA の増加が観察された(図 4)。

[考察]

PrP は神経細胞だけでなくグリア細胞においてもアポトーシス抑制的に作用していると考えられた。活性型 Caspase-9 の産生が PrP 再発現によって抑制されたことから Apaf-1 から上流で PrP がアポトーシス抑制的に作用していると考えられた。PrP は Np12 細胞において神経突起形成を促進させ、活性型 PKA の増加を伴ったことから、神経分化において PrP が cAMP/PKA を介したシグナル伝達系に参与していることを示唆した。

[結論]

PrP は Dpl の遠所発現によらずアポトーシス抑制能をもっている。

[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 DC., Li S, Nakamura T., Matsumoto Y., Saeki K., Itohara S., Ikuta K., Onodera T. : PrP cooperates with STI1 to regulate SOD activity in PrP-deficient neuronal cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 328 : 14-19, 2005
- 2) Sakudo A., Lee DC., Nishimura T., Li S., Tsuji S., Nakamura T., Matsumoto Y., Saeki K., Itohara S., Ikuta K., Onodera T. : Octapeptide repeat region and N-terminal half of hydrophobic region of prion protein (PrP) mediate PrP-dependent activation of superoxide dismutase. *Biochem Biophys Res Commun.* 326 :600-606, 2005
- 3) Nishimura T., Sakudo A., Nakamura I., Lee DC., Taniuchi Y., Saeki K., Matsumoto Y., Ogawa M., Sakaguchi S., Itohara S., Onodera T. : Cellular prion protein regulates intracellular hydrogen peroxide level and prevents copper-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323 : 218-222, 2004
- 4) Shyu WC., Lin SZ., Saeki K., Kubosaki A., Matsumoto Y., Onodera T., Chiang MF., Thajeb P., Li H. : Hyperbaric oxygen enhances the expression of prion protein and heat shock protein 70 in a mouse neuroblastoma cell line. *Cell. Mol. Neurobiol.* 24 : 257-268, 2004.
- 5) Sakudo A., Lee DC., 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.

[知的所有権の取得状況]

なし

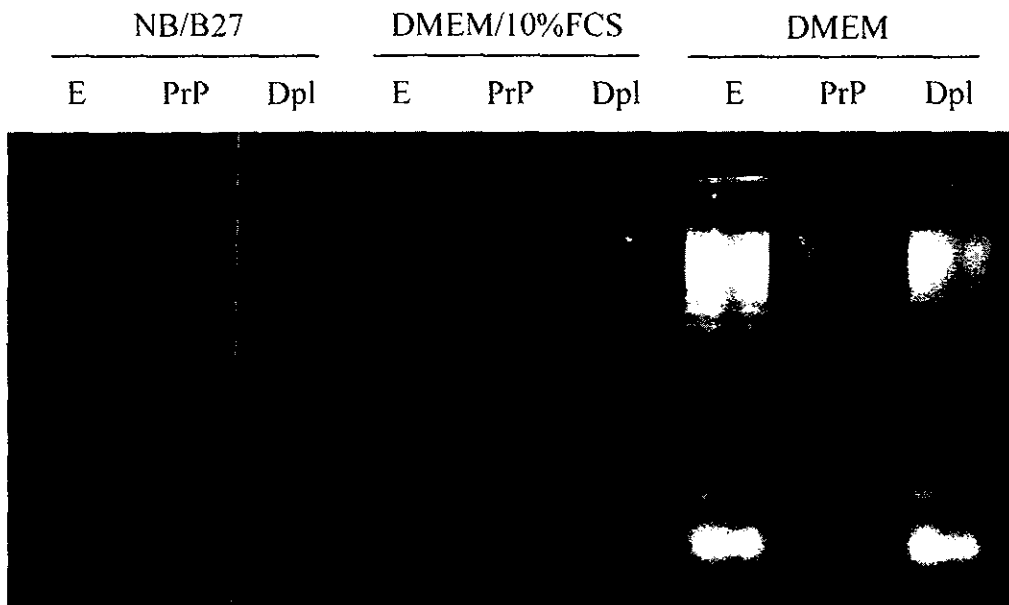


図1 Npl2 細胞において PrP 再発現はアポトーシス抑制的に働く E:Npl2-EGF, PrP: Npl2-PrP-EGFP, Dp 1: Npl2-Dpl-EGFP

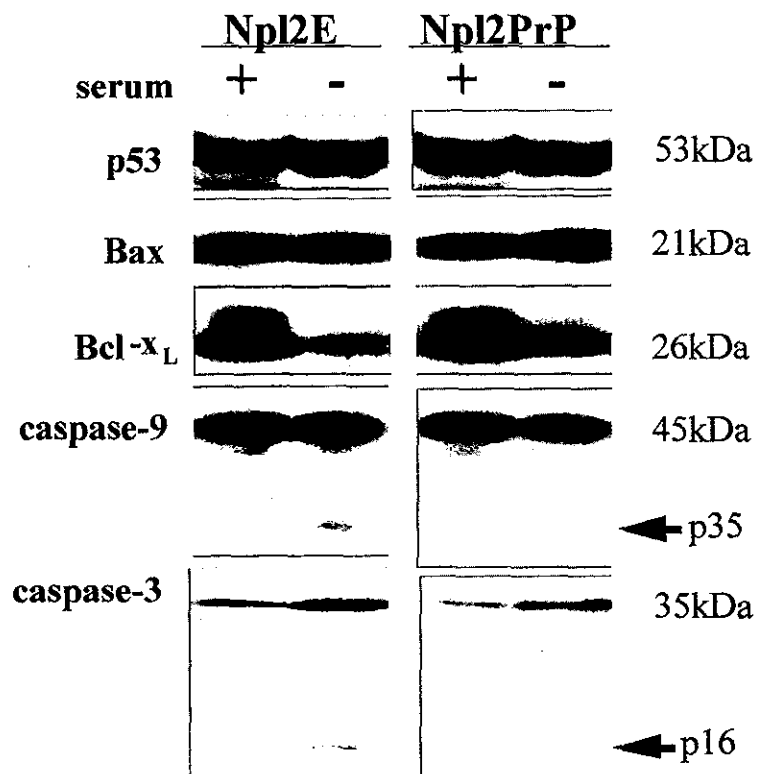


図2 アポトーシス誘導時における PrP 再発現細胞のカスパーゼ経路抑制

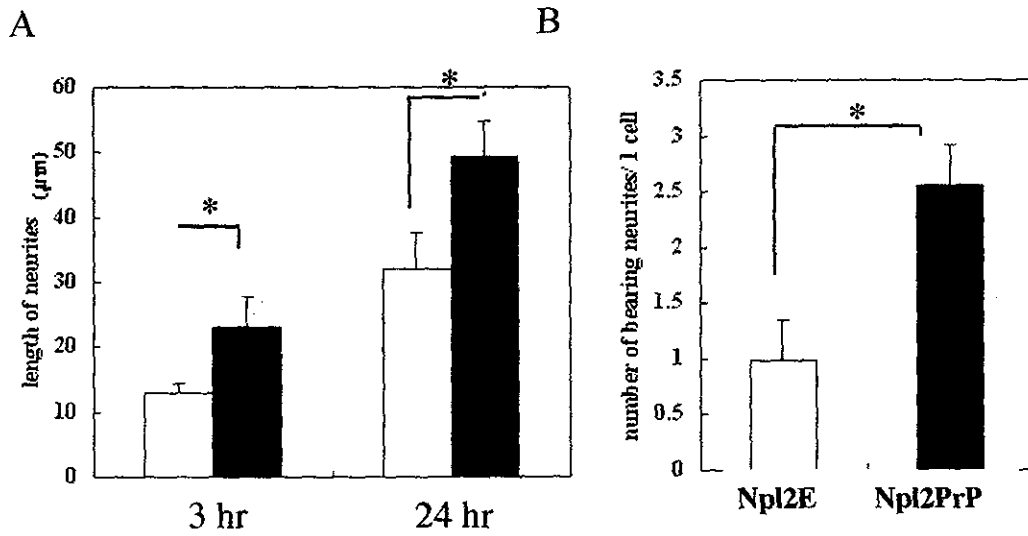


図3 培養時間経過にともなう Npl2 細胞の突起伸長と突起形成 (細胞当たりの突起の数)
□ : PrP 欠損 Npl2 細胞、■ PrP 再発現 Npl2 細胞、* : P < 0.05

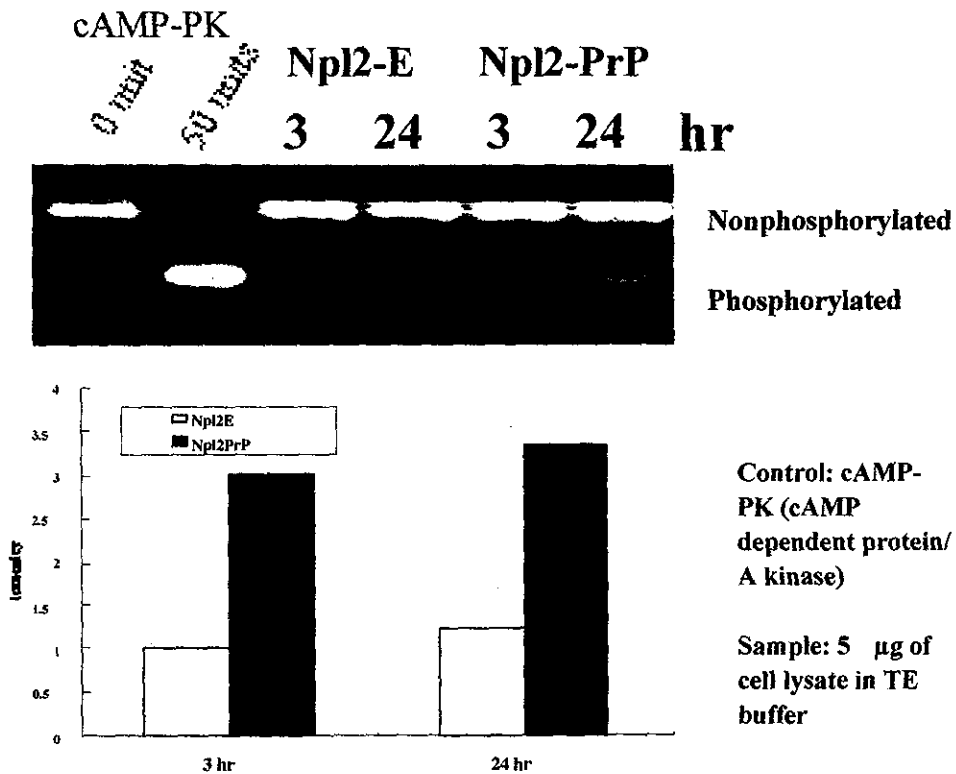


図4 PrP 再発現にともなう細胞内 PKA 活性の上昇
上図のリン酸化ペプチドの蛍光強度を下図にグラフ化した。□ : PrP 欠損 Npl2 細胞、■ PrP 再発現 Npl2 細胞

膜貫通型プリオン蛋白の異常化

班 員：村本 環（東北大学・大学院医・CJD 早期診断・治療法開発分野）

〔研究要旨〕

プリオン蛋白の構造、膜局在と異常化能・プリオン形成能・神経変性形成能の関係を調べるために、膜貫通型プリオン蛋白（プリオン蛋白と膜貫通型蛋白の融合蛋白）をデザインし、培養細胞で発現した場合の異常化能、ラフト移行性を検証した。検討した膜貫通型プリオン蛋白はいずれもその一部がラフトへ移行し、野性型プリオン蛋白より低い効率ながらも異常化した。この結果から、今後、膜貫通型プリオン蛋白を発現するトランスジェニックマウスを作製し、同マウスにおけるプリオン病の表現型を解析することは可能かつ有意義であると考えられた。

Membrane microdomain targeting and isoform conversion of prion protein transmembrane variants in cultured neuroblastoma cells

Tamaki MURAMOTO¹

¹Division of CJD Science and Technology, Department of Prion Research, Center for Translational and Advanced Animal Research on Human Diseases, Tohoku University Graduate School of Medicine

Abstract

In order to gain further insight into the relationship between the structure and membrane topology of prion protein and its ability to propagate prions and cause neurodegeneration, we designed transmembrane variants of prion protein by fusing prion protein with transmembrane proteins and analyzed their abilities to be targeted to raft/detergent-resistant membrane microdomain and to be converted to the protease-resistant isoform. In cultured neuroblastoma cells, transmembrane prion proteins were partly targeted to raft, and were converted to the protease-resistant isoform though less efficiently than wild type prion protein. The result provides rationale to the experiments to make transgenic mice that express one of the variant prion proteins and examine the phenotype of prion disease in these mice.

〔はじめに〕

著者らは、昨年度までの研究で、GPI アンカーを持たないプリオン蛋白を発現するマウスにおけるプリオン病では、プリオン蛋白の異常化、アミロイド化、プリオン形成は生じるが、海綿状変性は生じないことを観察した。このことは、プリオン蛋白の構造・膜局在がプリオン病の表現型の発生機序と密接に関係している可能性を示唆している。本年度からは、プリオン蛋白の構造・膜局在と異常化能・プリオン形成能・神経変性形成能の関係をさらに解析するために、膜貫通型プリオン蛋白を異常化させる試みを開始した。膜貫通型プリオン蛋白については、すでにプリオン感染培養細胞を用いた実験で1) ラフトへ移行しないこと、2) 異常化が検出出来ないことが報告されている^{1, 2)}。今回、著者は、これまで試みられたことのない「ラフト高移行性膜貫通型蛋白とプリオン蛋白の融合」により、膜貫通型プリオン蛋白を、ラフト高移行性で、かつ異常化効率の高いデザインにすることが可能か否かを検討した。

〔材料と方法〕

1) プリオン蛋白コンストラクトのデザインと作製：プリオン蛋白と下記の膜貫通型蛋白の融合蛋白をコードする遺伝子コンストラクトを作製した (図 1)。融合蛋白は、アミノ末端側のプリオン蛋白配列とカルボキシル末端側の膜貫通型蛋白配列から構成された。プリオン蛋白のアミノ酸配列としては、3F4 モノクローナル抗体で認識されるエピトープタグ (Met108/Met111) を導入したマウスプリオン蛋白配列 1-230 番 (PrP)、もしくは同配列中のアミノ酸 23-88 番を欠損するもの (PrP del) を採用した。膜貫通型蛋白としては、インフルエンザウイルス [Influenza A virus (strain A/Aichi/2/68)] の hemagglutinin (HA) の HA2 サブユニット、マウス T リンパ球の発現する LAT (linker for activation of T cells)、およびマウスの LDL レセプター (LDLR) を採用した。このうち HA と LAT はラフト高移行性蛋白であることが知られている^{3, 4)}。両者は、膜貫通ドメインと細胞内ドメインの境界部に複数のシステイン残基を持つという構造上の特徴を共有しており、同システインにパルミチン酸が付加されることが、膜貫通ドメインのアミノ酸配列とともに、蛋白の高ラフト移行性に寄与していると考えられている。融合に用いる膜貫通型蛋白に関しては、それぞれの分子のカルボキシル末端部の膜貫通ドメインと細胞内ドメインに相当する部分を融合に用い、LAT についてのみ、細胞内ドメイン全長を含むタイプ (PrP-LAT) と最もカルボキシル末端寄りのアミノ酸 196 個を欠損するタイプ (PrP-LAT del) の両方を作製した。HA および LDLR との融合蛋白 (PrP-HA, PrP del-HA, PrP-LDLR) については、プリオン蛋白配列と膜貫通型蛋白配列の連結部分に、膜貫通型蛋白の膜貫通ドメインのすぐアミノ末端側にある細胞外ドメインのアミノ酸配列を、0-4 個挿入したバリエーション (types 1-5) も作製した。完成したコンストラクトは、pSPOX 発現ベクターに組み込み、DOTAP (Roche) を用いてプリオン感染培養細胞 ScN2a および非感染細胞 N2a に導入した。遺伝子導入された細胞は、48 時間後に溶解バッファーで回収する (ScN2a の場合) か、または floatation assay (N2a の場合) に用いた。

2) Floatation assay を用いたラフト移行性の評価：N2a 細胞の floatation assay は、Naslavsky の方法⁵⁾を用いた。10 cm 径培養プレート上に confluent な状態の細胞をリン酸バッファーで洗浄したのち氷冷し、400 μ l の冷溶解バッファー (TNE/1% triton X-100) で溶解した。30 分間、氷上に静置したのち、400 μ l の冷 70% Nycodenz 液 (70% Nycodenz in TNE) を加え、溶解液を良く混ぜた後、480 μ l を氷冷した 2.2 ml 超遠心チューブに移した。Nycodenz の冷 step gradients (25, 22.5, 20, 18, 15, 12, and 8% in TNE) 各 240 μ l を順に加えた後、超遠心 (200,000 g, 4°C, 4 hrs) した。遠心終了後、200 μ l の fraction 10 個をサンプルの上面から順にピペットで回収した。各 fraction を 3F4 抗体を用いたウエスタンブロットで解析した。また、ラフトを含む fraction の同定は、HRP 標識 cholera toxin subunit B を用いた各 fraction のドットブロットで行った。

3) 溶解バッファーを用いて回収された ScN2a 細胞の溶解液を低速遠心することにより、核 DNA を含む不溶成分を除き、上清 (total lysate) を得た。Total lysate の一部をとり、それに Sarkosyl を 2% になるように、また proteinase K を 20 μ g/ml になるように加え、37°C で 30 分間加温した。Pefabloc (Roche) を加え、proteinase K を失活させたのち、サンプルの超遠心 (100,000 g, 20°C, 1 hr) を行った。遠心終了後、pellet を回収して PrPSc fraction として 3F4 抗体を用いたウエスタンブロットで解析した。一部の実験では、PrPSc fraction のウエスタンブロット用サンプルを PNGase F を用いて deglycosylation 処理した。

〔結果〕

1) Floatation assay の結果、PrP-HA 融合蛋白、PrP del-HA 融合蛋白、PrP-LAT 融合蛋白、PrP-LDLR 融合蛋白はいずれも、種々の程度にラフトへ移行した (図 2, 3)。いずれの蛋白のラフト移行性も、野性型プリオン蛋白のラフト移行性に比し劣っていた。PrP del-HA 融合蛋白と PrP-HA 融合蛋白のラフト移行性には明瞭な差は認められなかった。

2) PrPSc fraction 解析の結果、PrP-HA 融合蛋白、PrP del-HA 融合蛋白、PrP-LDLR 融合蛋白はいずれも、種々の効率で異常化した (図 4, 5)。異常化の効率は野性型に比して低いと思われた。

〔考察〕

本研究の結果、膜貫通型プリオン蛋白がラフトに移行しうることが明らかとなった。一方、ラフト高移行性膜貫通型蛋白 HA および LAT の膜貫通ドメインを用いて、膜貫通型プリオン蛋白のラフト移行性を野

性型プリオン蛋白並みに高めようとする試みは成功しなかった。最近、Walmsley ら⁹⁾はプリオン蛋白のアミノ酸 23-88 番が膜貫通型プリオン蛋白のラフト移行性を高めると報告したが、我々の実験では PrP-HA 融合蛋白と PrP del-HA 融合蛋白のラフト移行性に大きな差は認められず、Walmsley らの主張を確認することは出来なかった。ただし、この点については、今回検討していない PrP del-LDLR 融合蛋白のラフト移行性を合わせて評価することが結論を出す上で重要である。

膜貫通型プリオン蛋白の異常化は、予想されたよりも容易に検出された。いずれの融合蛋白についても、野性型プリオン蛋白に比して異常化効率は低い印象は否めないが、過去の報告が与える印象を修正し得た点で重要である。今回得られた所見は、今後予定している「膜貫通型プリオン蛋白を発現するトランスジェニックマウスを作製し、同マウスにおけるプリオン病の表現型を解析する実験」に合理的理由を与える。各コンストラクトの異常化効率を比較することにより、最も効率よく異常化する蛋白のデザインを確定し、同デザインをトランスジェニックマウス作製に採用する。今回の研究結果は、それらのマウスへのプリオン接種実験において、プリオン病の表現型（脳組織内での膜貫通型プリオン蛋白の異常化、マウスの発症、神経変性、プリオン増殖）が観察できる可能性を期待させるものである。それらの表現型を典型的表現型と比較することにより、本研究の究極の目標である「プリオン蛋白の構造・膜局在とプリオン病表現型の発生機序との関係」の解明が可能となる。

〔参考文献〕

- 1) Taraboulos A, Scott M, Semenov A, Avraham D, Laszlo L, Prusiner SB: Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J Cell Biol* 129: 121-132, 1995
- 2) Kaneko K, Vey M, Scott M, Pilhuhn S, Cohen FE, Prusiner SB: COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2333-22338, 1997
- 3) Scheiffele P, Roth MG, Simons K: Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *EMBO J* 16: 5501-5508, 1997
- 4) Zhang W, Tribble RP: LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity* 9: 239-246, 1998
- 5) Naslavsky N, Stein R, Yanai A, Friedlander G, Taraboulos A: Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *J Biol Chem* 272: 6324-6331, 1997
- 6) Walmsley AR, Zeng F, Hooper NM: The N-terminal region of the prion protein ectodomain contains a lipid raft targeting determinant. *J Biol Chem* 278: 37241-37248, 2003

〔研究発表〕

なし

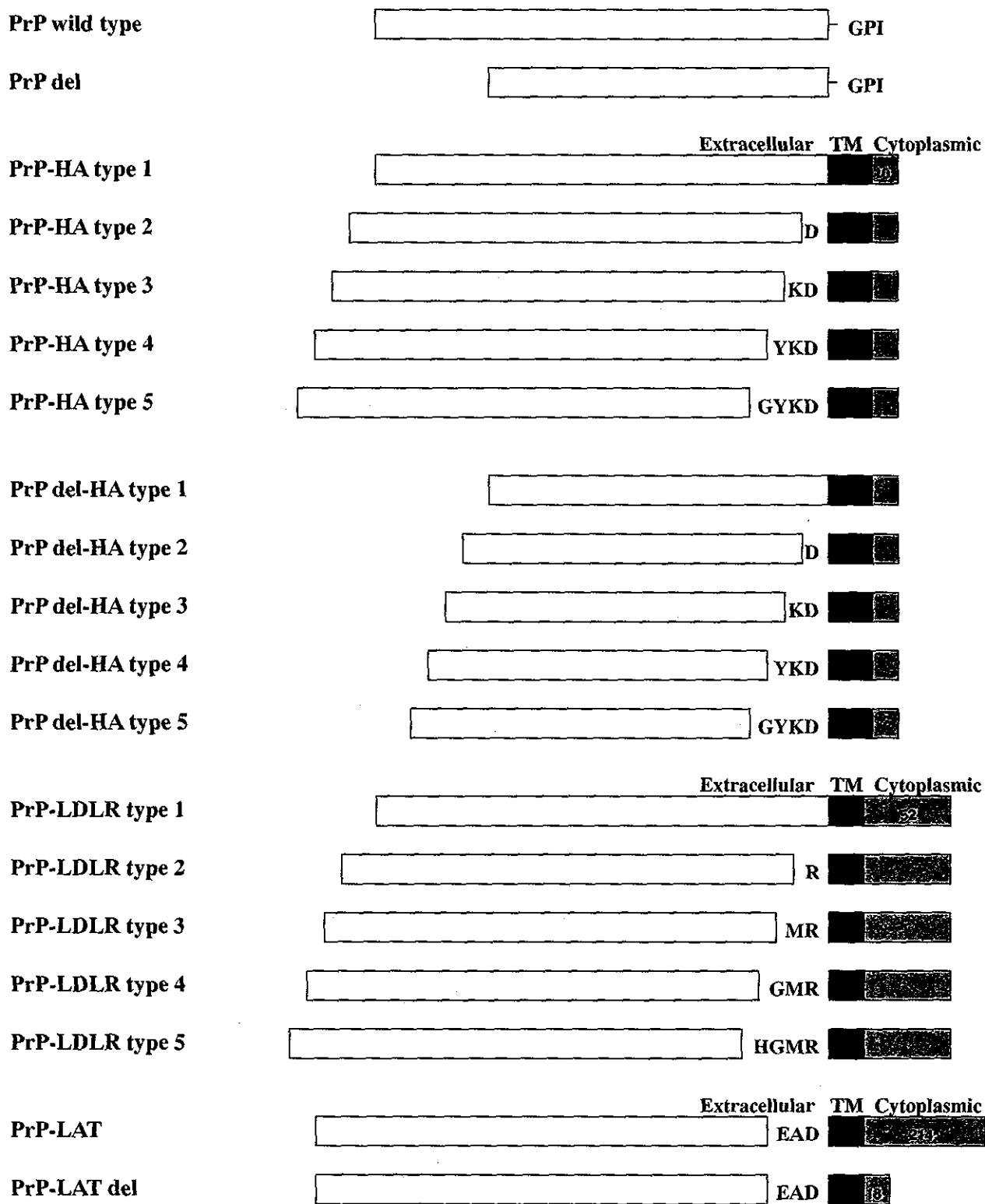


図1 プリオン蛋白コンストラクトの模式図

図中の白色の四角はプリオン蛋白ペプチドを、赤色の四角(TM)は膜貫通型蛋白由来の膜貫通ドメインを、桃色の四角(Cytoplasmic)は膜貫通型蛋白由来の細胞内ドメインをそれぞれ表す。白い四角と赤色の四角の間のアルファベットは、膜貫通型蛋白の細胞外ドメイン由来のアミノ酸(一文字表記)を表す。赤色および桃色の四角の中に書き入れられている数字は、各ドメインのアミノ酸の数を表す。全てのコンストラクトがプリオン蛋白のアミノ末端シグナルペプチドを持つが、図中では省略してある。