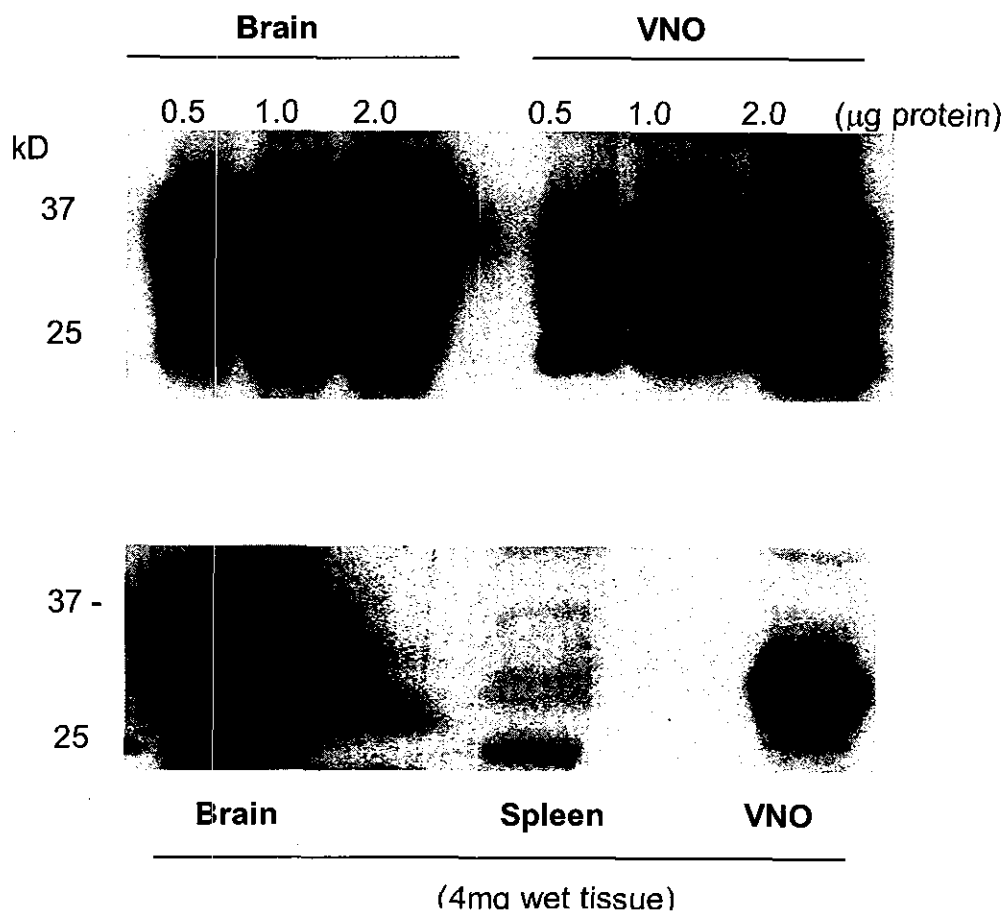
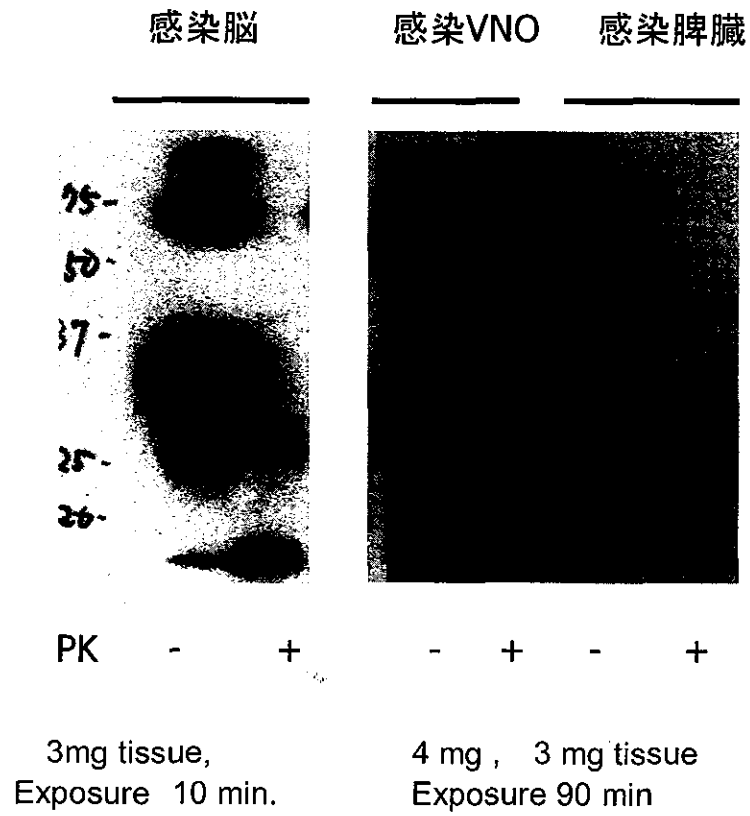


図2 マウス、ハムスターVNOにおける PrP^C発現



上段：ddY マウス、下段：ハムスター

図3 感染ハムスターVNOにおけるPK 抵抗性プリオン蛋白蓄積



263K i.p. 12 週目の各臓器を示す

図4 ウシ VNO の同定 (20ヶ月齢ホルスタイン)

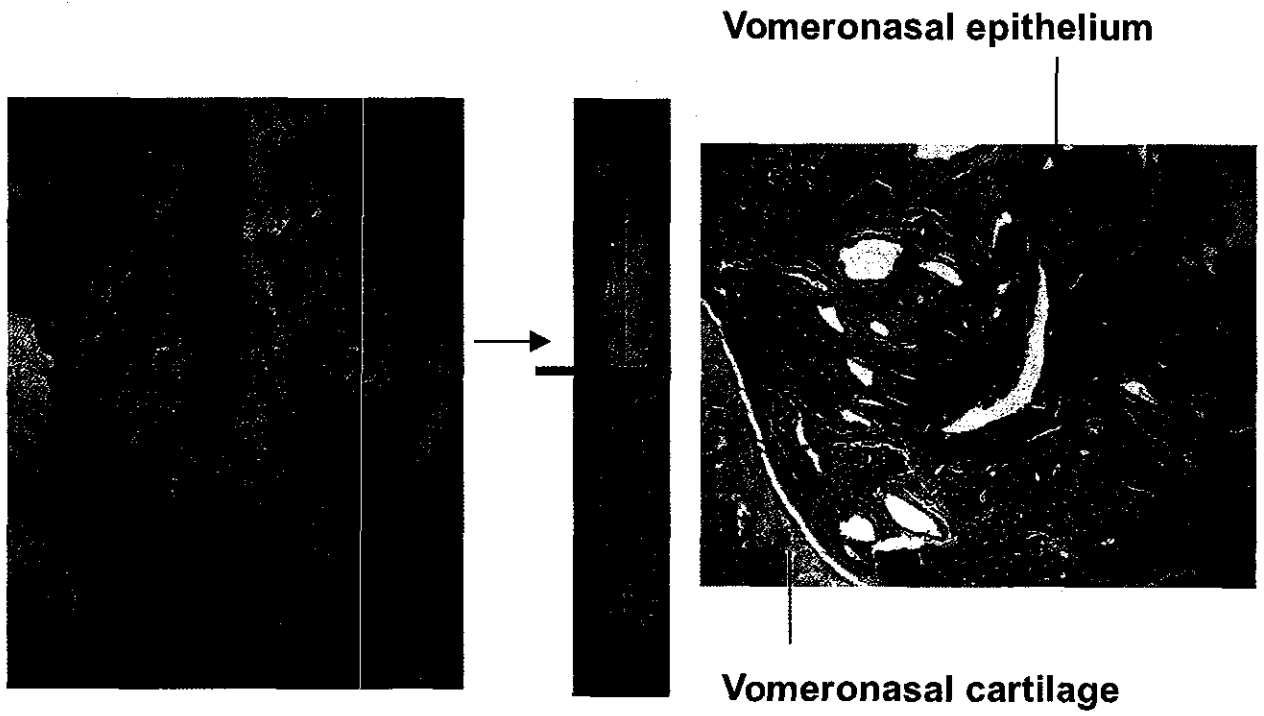
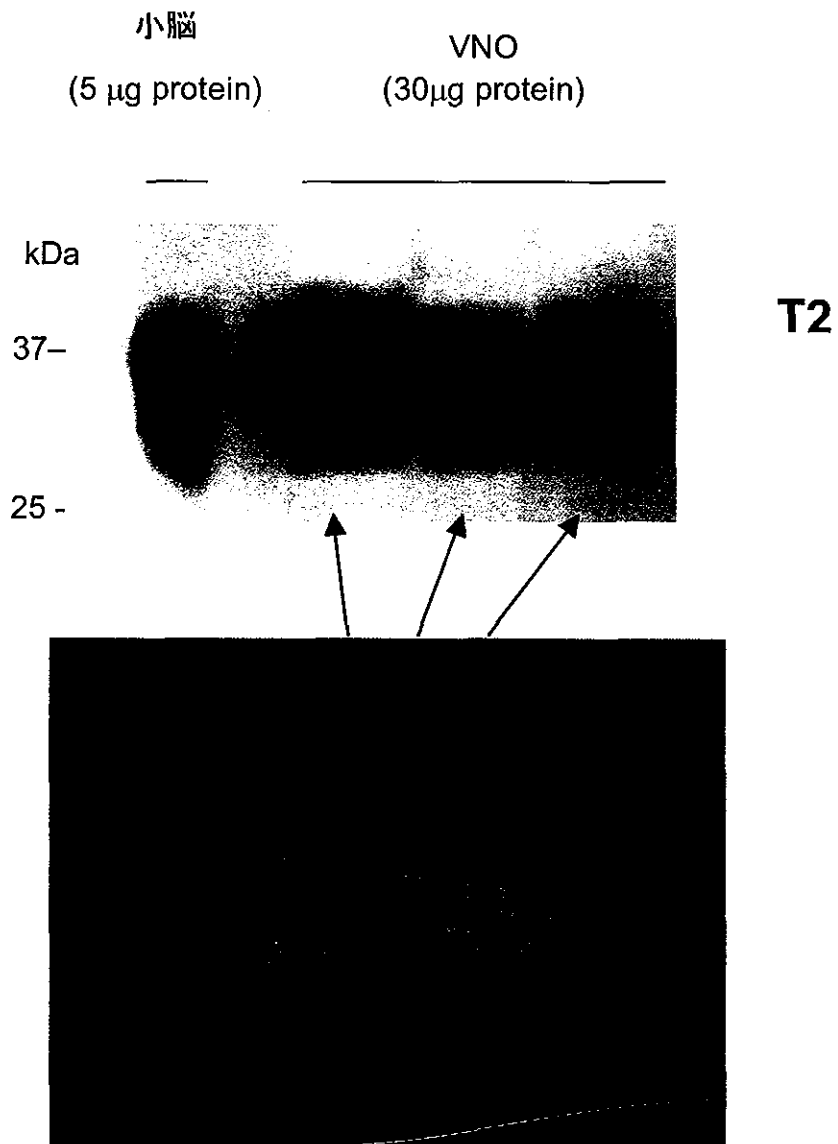


図5 ウシ VNO における PrP^C 発現



プリオン感染および治療に伴う遺伝子発現の解析

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）
班 員：村本 環（東北大学・大学院医・創生応用研・プリオン蛋白）
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：北本 哲之（東北大学・大学院医・創生応用研・プリオン蛋白）

【研究要旨】

プリオンの伝達機構の解明あるいは早期診断法の開発の基盤となる分子レベルの情報収集を目的として、伝播実験で増殖した異常感染型プリオンタンパク (PrP^{Sc}) が検出されるマウスの臓器を中心に（脳および脾臓、血液細胞）、マイクロアレイを用いて感染初期の遺伝子発現プロファイル調べた。発現する遺伝子は脾臓、脳の順に経時的に変動し類似性が見られた。特に脾臓では 201 遺伝子が顕著な変動を示したが炎症や免疫反応に起因するものは 3%以下であった。また、同様に PrP^{Sc} の増幅およびその阻害に関わる分子の情報を収集する目的で、プリオン持続感染マウス神経芽細胞腫株 ScN2a をコンゴレッド(CR)を用いて治療し遺伝子発現プロファイルを検索した。10000 遺伝子のうち顕著に変動した 96 遺伝子は、炎症や免疫反応、グリア細胞及びアストロサイト系の活性化に起因するものは少なかったが感染初期に脾臓や脳で見られたプロファイルとの共通性も少なく、PrP^{Sc} の増幅機序と CR による PrP^{Sc} への構造変換・増幅を阻止する機序との相違を示唆した。

Gene expression profiling of PrP^{Sc}-infected organs and Congo red-treated neuroblastoma cell line which is persistently infected with prion

Ichiro MIYOSHI, Shirou MOHRI*, Tomomi MIYAMOTO, Tamaki MURAMOTO**,
Tetsuyuki KITAMOTO**

Center for Experimental Animal Science, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences,
*Laboratory of Biomedicine, Graduate School of Medical Science, Kyushu University, **Division of CJD
Science and Technology, Department of Prion Protein Research, Tohoku University Graduate School of
Medicine

ABSTRACT

We attempted to profile the gene expression in mouse organs (brain and spleen), in which abnormal prion protein (PrP^{Sc}) were detected, at initial stage of experimental prion infection, to obtain evidence in the molecular level for the study of the mechanisms in prion infection and the development of early diagnosis. The gene expression profile varied in order of spleen, brain showing similarity between them. The study revealed 201 genes with altered mRNA level in spleen, however, less than 3% of them encode the molecules found in inflammatory reaction or immune response. We also analyzed the genes with altered expression patterns in the PrP^{Sc} persistently infected neuroblastoma cell line after treatment with Congo red, to investigate molecules playing important role in isoform conversion of PrP^C and its inhibition. The gene expression profile indicated 96 genes whose expression altered conspicuously. These genes seldom encode proteins involved in inflammatory reaction, immune response, or activation of astrocyte and microglia,

however, merely 6 of them was found in the above-mentioned 201 genes suggesting the different point of action in isoform conversion of PrP^C and its inhibition.

【はじめに】

近年、プリオン病に対する有効な治療法が開発されつつあるが、そのためには早期診断あるいは他の脳神経変性疾患との鑑別、更に PrP^{Sc} の伝達・増殖機構の解明が必要とされる。体内に侵入した PrP^{Sc} に対して、生体は PrP^{Sc} の増幅のみならず、異物に対する応答や病理学的変化、発症に関わる反応を示すが、最も病理学的変化の著しい脳、あるいは最も早期に PrP^{Sc} 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、感染の初期にはプリオン伝播に特徴的な分子の機能的発現、即ち遺伝子発現の変動として捕捉できる可能性がある。一方、PrP^{Sc} への構造変換や種の壁の試験管内解析に貢献してきた ScN2a 細胞¹⁾は CR 投与によって PrP^{Sc} の産生が阻止される、いわゆる治療が可能な実験系である。本研究では、以上のような実験系を用いて感染初期に特定の組織で起こる PrP^{Sc} への構造変換・増幅、及び培養細胞の治療に関与する分子を把握する目的でマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイリングを行った。

【目 的】

マイクロアレイにより、PrP^{Sc}接種したマウスの血液中の細胞および脾臓、脳などで網羅的・包括的に遺伝子の発現を解析し、プリオンの伝播・PrP^Cの異常化に伴う特徴的なプロファイルを調べる。CR存在下で培養することによりScN2aを治療し、PrP^{Sc}の産生阻止に伴う特徴的なプロファイルを調べる。以上により、PrP^Cの構造変換に関与する分子、あるいは早期診断や発症機構の解明、治療に有用な分子を探索する。

【材料と方法】

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 μ l および 50 μ 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。2 日及び 10 日、30 日後に安楽死させたマウスの血液及び脳、脾臓から抽出・部分精製した 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基に 6400 遺伝子を搭載する。）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。

次に、2.5 μ g/ml CR 存在下で 14 日間培養し、CR 除去後 14 日間経過してもウエスタンブロット法で PrP^{Sc} が検出されないことを指標に持続的な治療効果を確認した ScN2a あるいは対照の N2a(ScN2a の由来細胞株)から抽出した mRNA 及び Laser Techno Mouse 10K oligo DNA microarray を用いて遺伝子の発現を解析した。標準化したデータから、PrP^{Sc} を産生するか否かの因子 1 (ScN2a vs N2a) および CR 治療を施したか否かの因子 2 (CR 投与 vs 非投与) を同時に考慮に入れた二元配置分散分析 (2-way ANOVA) により、各々 ScN2a vs N2a あるいは CR 投与 vs 非投与群で発現の差が有意 ($p < 0.05$) である遺伝子を選び、更に、ScN2a-CR 投与 vs 非投与および N2a-CR 投与 vs 非投与、CR 投与-ScN2a vs N2a、非投与-ScN2a vs N2a に分類して明らかに 2 倍以上の変動を呈した遺伝子を抽出した。次に、ScN2a および N2a 間あるいは、CR 投与および非投与間での (非) 共通性に基づき遺伝子を分類した。

【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】

テンプレートに用いた 6,400 のうち合計 2,694 の遺伝子が発現変動を示したが、他の 2 臓器に比較して、脳で発現が変動する遺伝子の数は少なく約 1/4 程度であった。接種後、脳や脾臓では変動を示す遺伝

子のうち 1/4 が増強したが、血液中の細胞では約半分の遺伝子の発現が増強した。発現の変動した遺伝子数は、血中細胞及び脳では 2 日>30 日>10 日、脾臓では 10 日>30 日>2 日のように推移した。クラスタリング解析により、血液の全ての時期及び脳および脾臓の 2 日目のプロファイルは、各々の間でも、また他の臓器のプロファイルとの類似性も低い、脾臓および脳の 10、30 日目の遺伝子の発現プロファイルは明らかに近傍にあり類似性が見られた。10 及び 30 日後の脾臓で共通して発現変動を示す遺伝子は 201 個あったが、炎症や免疫反応に由来するものは 3%以下であった。更にそれらと 30 日目の脳のプロファイルと比較し、重複する 30 程度の遺伝子を図 1 に示した。これらは、従来、PrP^{Sc} を接種した脳で報告されたグリア細胞及びアストロサイト系の活性化や炎症反応、免疫応答、ストレス応答に由来するものが多い遺伝子発現プロファイルと顕著な相違を示した。

ScN2a の CR 治療の実験では、“CR 非投与の際 N2a を対照として、PrP^{Sc} を増幅する ScN2a で発現の変動する遺伝子”と“治療前を対照として、CR 治療によって PrP^{Sc} が検出されなくなった ScN2a で発現が変化した遺伝子”とで重複する遺伝子を抽出することにより、PrP^{Sc} の増幅及び CR 治療によるその阻害に関与する分子についての情報収集を試みた。その結果、捕捉された 96/10000 遺伝子は、同様に従来の接種実験での脳の遺伝子発現プロファイルとは明らかに異なるが(表 1)、前述の接種実験で選抜された 30 遺伝子との間にも共通性はなく、10 及び 30 日後の脾臓で共通して発現変動を示す 201 遺伝子に範囲を広げた場合は 6 遺伝子と重複した(表 2)。なお、転写レベルに関する限り PrP^C の発現は、ScN2a では N2a の 56%程度であるが、CR 治療による影響は受けなかった。一方、CR 治療により N2a では PrP^C の転写量は半減した。

【考 察】

プリオン病は、PrP^C が高次構造の変換によりプロテアーゼ抵抗性になり不溶化・凝集化した PrP^{Sc} が主に中枢神経系に蓄積することが原因とされている。発症に至るには他の脳神経変性疾患等と類似した機構も予測されることは治療法開発の重要ポイントの一つである。一方、プリオン感染・伝達の初期には特異的な遺伝子発現パターンが観察されることが期待される。そこで今回、プリオンの接種に伴い早期に変動を示す遺伝子プロファイルを探した。プリオン病の早期診断法や特異的な治療法の開発は勿論、根本的な PrP^{Sc} 増幅メカニズムの解明にも重要と考えられる。

最近報告されている実験的プリオン接種に伴う脳の遺伝子発現プロファイルでは、相当期間の後、発症には至らないが、変動する遺伝子数が顕著に増加する時期に呼応するようにグリア細胞及びストレス、炎症反応に由来する遺伝子が捉えられている。接種後約 189 日目に末期症状を示す 139A 株の接種実験では、腹腔内投与後 100 及び 125、150 日後の脳の遺伝子発現プロファイルにより、変化が顕著な 114/11000 遺伝子が捕捉され、その 7 割は炎症やストレス反応に起因すると考えられた²⁾。また、RML 株あるいは ME7 株を脳内投与し 30 及び 60、90、120 日後の脳の遺伝子発現を解析した報告では、PrP^{Sc} の増殖や病変の増強に由来すると考えられる 121/22000 遺伝子の発現が高くなったが、その時期は株によって異なった(各々 90 及び 120 日)³⁾。いずれの報告でも、PrP^{Sc} が増幅・蓄積される初期のプロファイルではあるが最も病理学的変化の激しい脳であるため、GFAP 及び CystatinF、Vimentin、SPI-2、Cathepsin、補体系、サイトカインなどのグリア細胞系及びアストロサイト系の活性化や炎症反応、免疫応答、ストレス応答に由来するものが顕著であり、相当部分はアルツハイマー病などの脳変性疾患や加齢変化のプロファイルと重なる。

マウスを用いたプリオン接種実験では、接種ルートに依存して新たに増幅された PrP^{Sc} の出現する時期と組織について詳細に調べられている。⁴⁻⁶⁾例えば、PrP^{Sc} が検出される組織は、脳内接種の場合は 3 週間後に脾臓(濾胞樹状細胞; FDC)、30 日後に視床及び三叉神経核、更に遅れて延髄の三叉神経核、90 日後には胸髄、大脳から脳幹、脊髄へ下降するようになり、120 日後に発症する、一方腹腔内接種では 1 週間後に脾臓 FDC、そして 120 日後から視床、三叉神経核、頸髄、胸髄、腰髄(180-210 日の間に 100%になる)に至り、250 日後に発症する。以上の点も考慮し、我々は対象臓器として、最も病理学的変化の著しい脳だけでなく、最も初期に PrP^{Sc} が出現する脾臓を用いる一方、体内に入っ

た PrP^{Sc} は移行すると考えられる点、さらに早期診断という側面から血中の細胞（リンパ球やマクロファージなど）を利用した。また、脳内及び腹腔内投与を併用し、遺伝子発現プロファイリングの時期を 2 日及び 10 日、30 日後に設定した。クラスターリング解析の結果、脳と脾臓で類似性が見られること、さらに脳よりも脾臓で早期から発現遺伝子が増幅される臓器および時期を反映すると考えられた。図 1 に示した遺伝子あるいは前述の 201 遺伝子は従来の報告とは明らかに異なり、グリア細胞及びアストロサイト系の活性化や炎症反応、免疫応答、ストレス応答に由来するものが少なく、感染初期且つ病変の少ない臓器を用いたことに起因すると考えられた。

プリオン接種に伴う生体の反応には、PrP^{Sc} への構造変換や増幅に関わるものに加え、異常タンパク反応および翻訳の低下、小胞体関連分解の促進、アポトーシスなどの non-native タンパクに対応するものが予想される。WW/Rsp5/WW ドメインを持つタンパクは β -シート構造を安定化させることが知られているが、予想に反して、脾臓で変動を示す 7 遺伝子のうち 6 種は発現が低下していた。同様に、異常タンパク反応に伴うシャペロン遺伝子あるいはユビキチン化などに伴う遺伝子の発現は増強するものは少なく減弱するものが多かった。また、血液中の細胞の遺伝子発現プロファイルでは、調べた限り全ての時期でプリオン接種に伴い Transmembrane 9 superfamily member 2 遺伝子の発現が著しく増強した。チャンネルあるいは小分子のトランスポーター膜タンパクと考えられるが意義は不明である。

種の壁に関する画期的な試験管内解析を可能にした細胞株 ScN2a は、CR 存在下で培養することにより転写レベルでの PrP^C は変わらないが、PrP^{Sc} は検出されなくなった。期待したように、主に脳の病変に関与すると考えられるグリア細胞系及びアストロサイト系の活性化や炎症反応、免疫応答、ストレス応答に由来する遺伝子の変動は少なく、GFAP あるいは CystatinF, Vimentin, SPI-2, Cathepsin などは捕捉されなかった（表 1）。しかしながら“CR 治療による、PrP^{Sc} の増幅及びその阻害に関与する分子”を選抜したためか、マウス接種実験で絞り込んだ遺伝子群と重複するものが少ない（表 2）点は CR の作用機序に起因するかもしれない。

個体レベルの接種実験では、感染初期に病理変化の小さい組織の遺伝子発現プロファイリングにより、プリオンが体内に侵入した際の生体応答の中から PrP^{Sc} への構造変化と蓄積以外のものを排除できる可能性がある。また、培養細胞系による試験管内治療及び再感染実験で得られるプロファイルと個体レベルのプロファイルを比較解析することでその精度を上げることが期待できる。いずれの場合もテンプレートの数を増やし、再現性の高いデータを収集する予定である。

【結 論】

プリオン感染初期の脾臓および脳では、病変に由来するグリア細胞系及びアストロサイト系の活性化や炎症反応、免疫応答、ストレス応答ではなく、PrP^{Sc} への構造変化と蓄積に特異的な遺伝子発現プロファイルを検索できる可能性がある。また、実験的に治療した培養細胞の遺伝子発現プロファイルも PrP^{Sc} の増幅及びその阻害に関与する分子の情報源として有用であることから、個体レベル及び治療・再感染など種々の培養細胞系の実験で得られたプロファイルの比較解析が期待される。

【参考文献】

- 1) Butler D.A., Scott M.R.D., Bockman J.M., Borchelt D.R., Taraboulos A., Hsiao K.K., Kingsbury D.T., Prusiner S.B.: Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins. *J Virol.* 62: 1558-1564, 1988
- 2) Riemer C., Neidhold S., Burwinkel M., Schwarz A., Schultz J., Krätzschmar J., Mönning U., Baier M.: Gene expression profiling of scrapie-infected brain tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 323: 556-564, 2004
- 3) Xiang W., Windl O., Wunsch G., Dugas M., Kohlmann A., Dierkes N., Westner I.M., Kretzschmar H.A.: Identification of differentially expressed genes in scrapie-infected mouse brains by using global gene expression technology. *J Virol.* 78: 11051-11060, 2004

- 4) Kitamoto T., Muramoto T., Mohri S., Doh-ura K., Tateishi J.: Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol.* 65: 6292-6295, 1991
- 5) Muramoto T., Kitamoto T., Hoque M.Z., Tateishi J., Goto I.: Species barrier prevents an abnormal isoform of prion protein from accumulating in follicular dendritic cells of mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol.* 67: 6808-6810, 1993
- 6) Muramoto T., Kitamoto T., Tateishi J., Goto I.: Accumulation of an abnormal prion protein in mice with Creutzfeldt-Jakob disease via intraperitoneal route: A sequential study. *Am J Pathol.* 143: 1470-1479, 1993

【研究発表】

なし

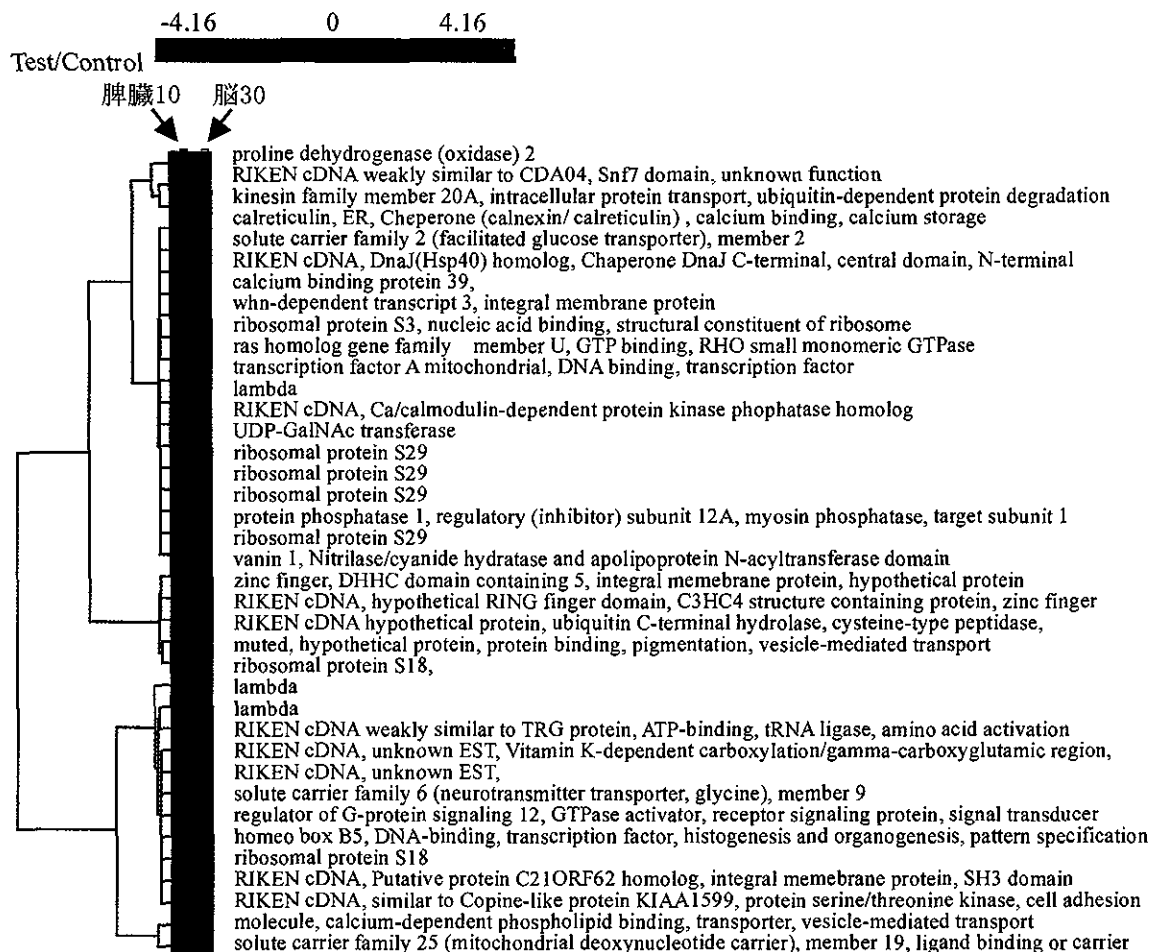


図 1. 脾臓（10 日）及び脳（30 日）で共通して発現が変化する遺伝子

表 1. PrP^{Sc} の増幅及び CR 治療による阻害に関与する
遺伝子とそのカテゴリー分類

Membrane, Plasma membrane	26
Raft	1
Chaperon activity	1
HSP	1
Golgi apparatus	1
Lipid binding, metabolism	1
Proteolysis	3
Cell adhesion	6
Matrix	2
Complement	1
Cytokine	1
Cell growth and maintenance	40
Signal transduction	9
Cell communication	16
Metabolism	24
Cytoskeleton	3

表 2. 接種実験及び ScN2a の CR 治療のプロファイリングで重複した遺伝子

Ran binding protein 17; ranbp17 (G-protein coupled receptor protein signaling pathway,
protein transporter activity, RAN protein binding)
Muts homolog 5 (e. coli)(meiotic reciprocal recombination or mismatch repair)
cDNA clone homolog to etaa16 protein (FAD-containing monooxygenase)
Protocadherin 8

Homolog to hypothetical 55.4 kda protein (PRP31 pre-mRNA processing factor 31 homolog)
Actin related protein 2/3 complex, subunit 1a (41 kda); arp1a

正常プリオン蛋白質関連因子に関する研究

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β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。

昨年度までの検討により、我々は正常に folding された分子を認識し、それを unfold する活性を有するシャペロン様分子を同定し、“Unfoldin”と命名した。試験管内で Unfoldin がプリオン蛋白質、アミロイドβペプチド(1-42)、α-synuclein などのβシート構造をもつ蛋白質を unfold できるか否か、トリプシン感受性を用いたアッセイ系により検討した結果、ATP 存在下において Unfoldin はこれら基質の高次構造を unfold し、トリプシン感受性をあげる事ができた。

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 identified an ATP-dependent chaperone isolated from *Saccharomyces cerevisiae* denoted “Unfoldin”. This protein is an oligomeric form of actin-interacting protein 2 (Aip2p) /D-lactate dehydrogenase protein 2 (Dld2p). Oligomeric Aip2p/Dld2p exhibits the unique grapple-like structure with an ATP-dependent opening, which is required for the F-actin conformation modifying activity *in vitro* and *in vivo*. In the presence of 1 mM ATP or AMP-PNP, oligomeric Aip2p/Dld2p bound to all substrates so far examined, and modified the conformation of actin, DNase I, the mature form of invertase, prepro-α-factor (ppαF), pro-α-factor (proαF), and mitochondrial superoxide dismutase (SOD), as determined by the trypsin susceptibility assay. Of note, the activity could modify even the conformation of pathogenic highly aggregated polypeptides, such as recombinant prion protein (PrP) in β-sheet form, α-synuclein, and amyloid β (1-42) in the presence of ATP. The *in vivo* protein conformation modifying activity, however, depends on the growth stage; the most significant substrate modification activity was observed in yeast cells at the log phase, suggesting the presence of a cofactor/s in yeast cells, where F-actin is supposed to be a major target *in vivo*. These data further support our previous notion that the oligomeric Aip2p/Dld2p may belong to an unusual class of molecular chaperone, which can target both properly-folded and misfolded proteins in an ATP-dependent manner *in vitro*.

〔はじめに〕

感染型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の複製機構としては、正常型プリオン蛋白質 (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が、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、分解を受けるか変換されるかという互いに相補的な関係を有する。この領域は非常に疎水性に富んでいるため、親水性の環境化においては分子内部に埋没していると考えられるため、PrP^C 高次構造の解きほぐしが必要である可能性が示唆される。これには、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 因子との関連も注目される。

しかしながら、これらの unfolding 活性は正常に folding 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 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。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として、新しい分子「Unfoldin」を同定することに成功し、その細胞内動態並びに生理機能の詳細に関する解析を行ってきた。本年度は、その幅広い基質特異性に注目し、特に難溶性であり、凝集性の高い標的分子に対する unfolding 活性を検討した。

〔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新規分子群を同定し作用機序を検討する。本年度は、引き続き「Unfoldin」に関する詳細な解析を行った。

〔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 (unfolding assay)、酵母より同定した「Unfoldin」を大量に精製し、その構造解析並びに主に *in vitro* での活性、*in vivo* における Unfoldin の活性調節機構を検討してきた。前述のごとく、本年度は難溶性であり凝集性の高い標的分子に対する unfolding 活性を検討した。

〔倫理面への配慮〕

我々の実験は、既に確立された細胞培養系を用いるのみであり、倫理的な問題は生じないと考える。

〔結果〕

昨年度までの検討により、Unfoldin は正常に folding された蛋白質を unfold する新規クラスの分子シャペロンと考えられた。Unfoldin は分子量約 58 kDa、10-12 量体からなるオリゴマーを形成していた。注目すべき点として、ATP 依存性にその一端を開口した、いわゆるカニの爪状の開口状態 (活動性) と、閉口状態 (非活動性) の2つの分子構造が認められた。また、Unfoldin は *in vitro* においては非常に幅広い specificity を有していた。本年度の検討により、Unfoldin は複数の β -シート構造を有する分子も標的にし得ることを明らかにした。試験管内で Unfoldin がプリオン蛋白質、アミロイド β ペプチド(1-42)、 α -synuclein などの β -シート構造をもつ蛋白質を unfold できるか否か、トリプシン感受性を用いたアッセイ系により検討した結果、ATP 存在下において Unfoldin はこれら基質の高次構造を unfold し、トリプシン感受性をあげる事ができた (図 1)。

〔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 folding された分子を認識し、その立体構造を解きほぐすことで、むしろ非正常化する働きを有する。このことは、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に通ずる発見と考えている。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様の分子であると考えられる。本年度の検討により、Unfoldin は、強固な凝集体を形成する β -

タシート構造に富んだ分子をも解きほぐすことが明らかとなった。このことは、プリオン病等のベータシート構造たんぱく質に由来する疾患群の新しい治療戦略となりうる可能性を示唆する。さらに、凝集性が問題となるような様々な分野、特に組織解析学や、質量分析 (LC-MS/MS) の分野において、その unfolding 活性が幅広く応用できるであろう。実際に予備的な検討を行ったところ、従来解析不可能であった組織切片上の凝集体の解析や、膜蛋白質等の LC-MS/MS 等において、顕著な解析効率の増加を得ている (未発表データ)。

【結論】

昨年度までに同定した、正常に folding された蛋白質を標的として unfolding する新しいクラスの分子シヤペロン、"Unfoldin"に関する更なる検討を行った。Unfoldin は、強固な凝集体をも解きほぐす可能性を有しており、新しいプリオン病の治療戦略となりうる可能性が示唆された。のみならず、組織解析学や質量分析の分野において、凝集性の高い解析困難な分子群を標的とした研究に関する幅広い応用が期待される。

【参考文献】

- 1) Amberg DC, Basart E, Botstein D: Defining protein interactions with yeast actin in vivo. *Nat Struct Biol.* 2: 28-35.,1995
- 2) Chelstowska A, Liu Z, Jia Y, Amberg D, Butow RA: Signalling between mitochondria and the nucleus regulates the expression of a new D-lactate dehydrogenase activity in yeast. *Yeast.* 15: 1377-1391.,1999
- 3) Flick MJ, Konieczny SF: Identification of putative mammalian D-lactate dehydrogenase enzymes. *Biochem Biophys Res Commun.* 295: 910-916,2002
- 4) Hachiya NS, Sakasegawa Y, H. S, Jozuka A, Tsukita S, Kaneko K: Oligomeric Aip2p/Dld2p forms a novel grapple-like structure and has an ATP-dependent F-actin conformation modifying activity in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 320: 1271-1276,2004
- 5) Hachiya NS, Sakasegawa Y, Jozuka A, Tsukita S, Kaneko K: Interaction of d-lactate dehydrogenase protein 2 (Dld2p) with F-actin: implication for an alternative function of Dld2p. *Biochem Biophys Res Commun.* 319: 78-82,2004
- 6) 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
- 7) Harris DA, Huber MT, van Dijken P, Shyng SL, Chait BT, Wang R: Processing of a cellular prion protein: identification of N- and C-terminal cleavage sites. *Biochemistry.* 32: 1009-1016,1993
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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) Hachiya NS, Watanabe K, Sakasegawa Y, Kaneko K: Microtubules-associated intracellular localization of the NH2-terminal cellular prion protein fragment. *Biochem Biophys Res Commun.*, 313: 818-823, 2004
- 2) Tremblay P, Ball HL, Kaneko K, Groth D, Hegde RS, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB, Safar SJ: Mutant PrP^{Sc} Conformers Induced by a Synthetic Peptide and Several Prion Strains. *J Virol.* 78: 2088-2099, 2004

- 3) Hachiya NS, Watanabe K, Yamada M, Sakasegawa Y, Kaneko K: Anterograde and retrograde intracellular trafficking of fluorescent cellular prion protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 315: 802-807, 2004
- 4) Kishida H, Sakasegawa Y, Watanabe K, Yamakawa Y, Nishijima M, Kuroiwa Y, Hachiya NS, Kaneko K: Non-glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored recombinant prion protein with dominant-negative mutation inhibits PrP^{Sc} replication *in vitro*. *Amyloid.* 11: 14-20, 2004
- 5) Hachiya NS, Sakasegawa Y, Jozuka A, Tsukita S, Kaneko K: Interaction of D-lactate dehydrogenase protein 2 (Dld2p) with F-actin: Implication for an alternative function of Dld2p. *Biochem Biophys Res Commun.* 319: 78-82, 2004
- 6) Hachiya NS, Sakasegawa Y, Sasaki H, Jozuka A, Tsukita S, Kaneko K: Oligomeric Aip2p/Dld2p forms a novel grapple-like structure and has an ATP-dependent F-actin conformation modifying activity *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun.* 320: 1271-1276, 2004
- 7) Hachiya NS, Sakasegawa Y, Sasaki H, Jozuka A, Tsukita S, Kaneko K: Oligomeric Aip2p/Dld2p modifies the protein conformation of both properly-folded and misfolded substrates *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun.* 323:339-344, 2004
- 8) Hachiya NS, Yamada M, Watanabe K, Jozuka A, Ohkubo T, Sano K, Takeuchi Y, Kozuka Y, Sakasegawa Y, Kaneko K. Mitochondrial localization of cellular prion protein (PrP^C) invokes neuronal apoptosis in aged transgenic mice overexpressing PrP^C. *Neurosci Lett.* 374: 98-103, 2005
- 9) Hachiya NS, Watanabe K, Kawabata MY, Jozuka A, Ohkubo T, Kozuka Y, Sakasegawa Y, Kaneko K. A disease isoform of fluorescent prion protein (PrP) with Y145STOP induces mitochondria-mediated apoptosis and forms PrP aggregates. *Biochem Biophys Res Commun.* 327:894-899, 2005

2. 学会発表

1. Sekijima M, Motono C, Noguchi T, Kaneko K, and Akiyama Y. Molecular Dynamics Simulation of Wild-Type and Mutant Human Prion Protein: Effect of Pro102Leu. 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science (PRICPS2004). Yokohama, 2004
2. Sekijima M, Motono C, Noguchi T, Kaneko K, and Akiyama Y. Structural Changes in flexible region of the Prion Protein induced by P102L Substitution: Investigation through Molecular Dynamics Simulations. 18th Annual Symposium of the The Protein Society. San Diego, 2004
3. Hachiya NS, Yamada M, Watanabe K, Jozuka A, Ohkubo T, Kozuka Y, Sakasegawa Y, and Kaneko K. Mitochondrial localization of cellular prion protein (PrP^C) invokes neuronal apoptosis in aged transgenic mice overexpressing PrP^C. International Symposium of Prion Diseases in Sendai JAPAN. Sendai, Oct 31-Nov. 2, 2004
4. Hachiya NS, Yamada M, Jozuka A, Kozuka Y, Sakasegawa Y, and Kaneko K. Prion disease and protein unfolding chaperone:Unfoldin/Oligomeric Aip2p. International Symposium of Prion Diseases in Sendai, JAPAN. Sendai, Oct 31-Nov. 2, 2004
5. Hachiya NS, Watanabe K, Sakasegawa Y, and Kaneko K. Anterograde and retrograde intracellular trafficking of fluorescent cellular prion protein. International Symposium of Prion Diseases in Sendai JAPAN. Sendai, Oct 31-Nov. 2, 2004
6. Sakasegawa Y, Kishida H, Watanabe K, Hachiya NS, and Kaneko K. A non-glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored recombinant prion protein with dominant negative mutation inhibits PrP^{Sc} replication *in vitro*. International Symposium of Prion Diseases in Sendai JAPAN. Sendai, Oct 31-Nov. 2, 2004
7. Iwanami N, Sankawa U, Saido TC, Yamakawa Y, Nishijima M, and Kaneko K. Screening study of prion binding agents and their inhibitory effect on the conversion of prion protein. International Symposium of Prion Diseases in Sendai JAPAN. Sendai, Oct 31-Nov. 2, 2004

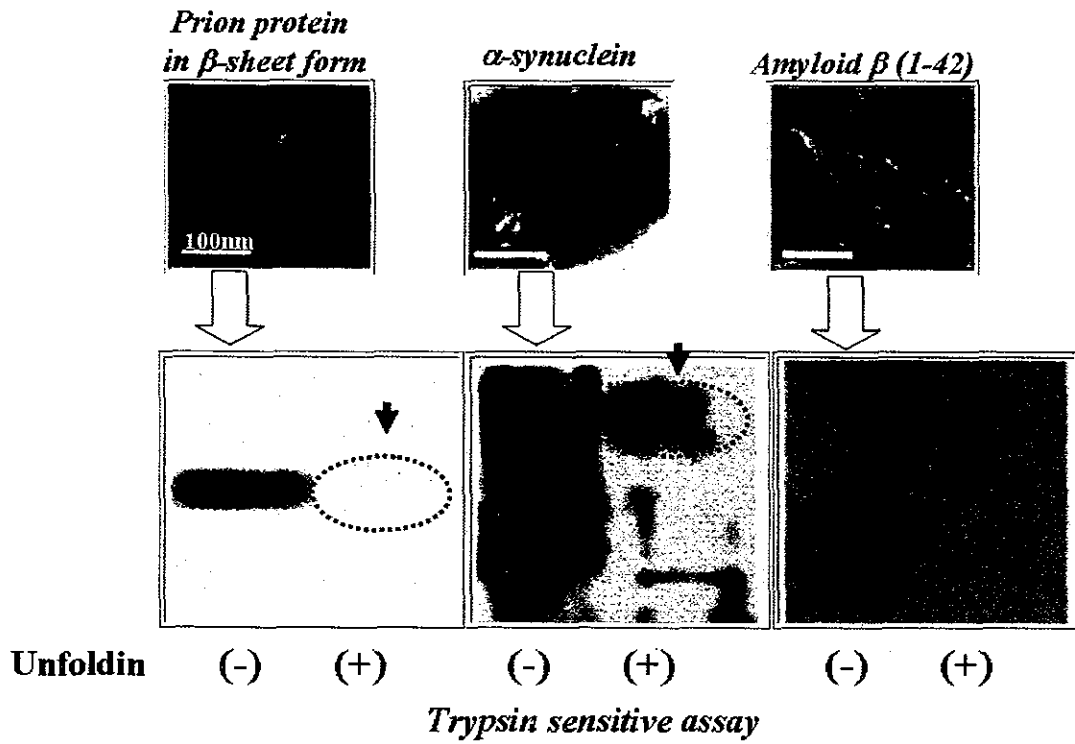
8. Hachiya NS, Yamada M, Jozuka A, Sakasegawa Y, and Kaneko K. Prion disease and Unfoldase: an ATP-dependent novel protein-unfolding chaperone. KEYSTONE SYMPOSIA: Molecular Mechanisms of Transmissible Spongiform Encephalopathies. Colorado, Jan. 11 -15, 2005
9. Kaneko K, Yamada M, Watanabe K, Jozuka A, Ohkubo T, Sakasegawa Y, and Hachiya NS. Mitochondrial localization of cellular prion protein (PrP^C) invokes neuronal apoptosis in aged transgenic mice overexpressing PrP^C. KEYSTONE SYMPOSIA: Molecular Mechanisms of Transmissible Spongiform Encephalopathies. Colorado, Jan. 11 -15, 2005
10. 金子清俊. 牛海綿状脳症 (BSE) と人変異型クロイツフェルト・ヤコブ病. 第10回原子力安全シンポジウム(原子力安全委員会). 東京, 2.7, 2004
11. 金子清俊. 欧州の食のリスクコミュニケーション. 食のリスクコミュニケーション意見交換会(内閣府). 東京, 2.16, 2004
12. 金子清俊. 牛海綿状脳症 (BSE) と人変異型クロイツフェルト・ヤコブ病. 食の安全安心フォーラム(内閣府). 大阪., 3.4, 2004
13. 金子清俊. BSEとその食へのリスク. 食のリスクコミュニケーション講演会(内閣府). 東京, 3.13, 2004
14. 金子清俊. プリオン蛋白質の複製に関与する因子. 産業総合研究所特別セミナー. 東京, 4.7, 2004
15. 金子清俊. BSEとその食へのリスク. 食のリスクコミュニケーション講演会(内閣府). 東京, 4.20, 2004
16. 金子清俊. BSEとその食へのリスク. 食のリスクコミュニケーション講演会(内閣府). 名古屋, 5.21, 2004
17. 金子清俊. BSEとその食へのリスク. 食のリスクコミュニケーション講演会(内閣府). 仙台, 6.8, 2004
18. 金子清俊. プリオンたんぱく質の細胞内輸送と細胞死のメカニズム. 第8回日本神経ウイルス研究会. 札幌, 6.12, 2004
19. 金子清俊. BSEとクロイツフェルト・ヤコブ病. 第13回PCR感染症検査研究会. 東京, 6.25, 2004
20. 金子清俊. BSEとその食へのリスク. 食品に関するリスクコミュニケーション意見交換会(内閣府). 東京, 8.4, 2004
21. 金子清俊. BSEとその食へのリスク. 食品に関するリスクコミュニケーション意見交換会(厚生労働省). 東京, 8.18, 2004
22. 金子清俊. BSEとその食へのリスク. 食品に関するリスクコミュニケーション意見交換会(内閣府). 大阪, 8.24, 2004
23. 金子清俊. 牛海綿状脳症 (BSE)と人変異型クロイツフェルト・ヤコブ病. 全国消費者団体連絡会. 東京, 8.27, 2004
24. 金子清俊. 日本における牛海綿状脳症 (BSE)対策について - 中間とりまとめ -. 食品に関するリスクコミュニケーション意見交換会(内閣府). 東京, 9.16, 2004
25. 金子清俊. 日本における牛海綿状脳症 (BSE)対策について - 中間とりまとめ -. 食品に関するリスクコミュニケーション意見交換会(内閣府). 大阪, 9.18, 2004
26. 金子清俊. 日本における牛海綿状脳症 (BSE)対策について - 中間とりまとめ -. 食品に関するリスクコミュニケーション意見交換会(厚生労働省). 神戸, 9.22, 2004
27. 金子清俊. 日本における牛海綿状脳症 (BSE)対策について - 中間とりまとめ -. 食品に関するリスクコミュニケーション意見交換会(内閣府). 岡山, 9.28, 2004
28. 金子清俊. 牛海綿状脳症 (BSE)と人変異型クロイツフェルト・ヤコブ病. 日本農芸化学会関東支部大会. 東京, 10.2, 2004
29. 金子清俊. プリオン病. 福島県立医科大学脳神経外科学教室招待講演. 福島, 10.21, 2004

30. 金子清俊. 日本における牛海綿状脳症 (BSE)対策について - 中間とりまとめ -. リスクコミュニケーション意見交換会 (農水省). 京都, 11.5, 2004
31. 金子清俊. Unfoldin-治療法への応用-. 国際ヤコブデー. 東京, 11.12, 2004
32. 金子清俊. 日本における牛海綿状脳症 (BSE)対策について - 中間とりまとめ -. 食品に関するリスクコミュニケーション意見交換会 (内閣府). 鹿児島, 11.17, 2004
33. 金子清俊. 日本における牛海綿状脳症 (BSE)対策について - 中間とりまとめ -. 食品に関するリスクコミュニケーション意見交換会 (内閣府). 宮崎, 11.18, 2004
34. 金子清俊. 日本における牛海綿状脳症 (BSE)対策について - 中間とりまとめ -. 食品に関するリスクコミュニケーション意見交換会 (内閣府). 京都, 12.13, 2004
35. 金子清俊. 日本における牛海綿状脳症 (BSE)対策について - 中間とりまとめ -. 食品に関するリスクコミュニケーション意見交換会 (内閣府). 名古屋, 12.13, 2004
36. 池袋 一典, 小笠原大輔, 金子 清俊, 早出広司. 大腸菌組換え生産におけるプリオンの水溶性画分への発現. 日本生物工学会. 名古屋. 9.21, 2004.
37. 八谷如美, 定塚昌子, 逆瀬川裕二, 金子清俊. プリオン病と蛋白質アンフォールディング因子; Unfoldin. 第 27 回神経科学会・第 47 回日本神経化学会大会. 大阪. 9.21-23, 2004
38. 渡邊光太, 八谷如美, 定塚昌子, 逆瀬川裕二, 金子清俊. 正常型プリオン蛋白質の細胞内輸送機構の解析. 第 27 回神経科学会・第 47 回日本神経化学会大会. 大阪. 9.21-23, 2004
39. 逆瀬川裕二, 八谷如美, 金子清俊. HSP90 β による正常型プリオン蛋白質高次構造変換機構の解析. 第 27 回神経科学会・第 47 回日本神経化学会大会. 大阪. 9.21-23, 2004
40. 金子清俊, 山田真紀子, 定塚昌子, 大久保卓也, 逆瀬川裕二, 八谷 如美. プリオン蛋白質過剰発現老齢トランスジェニックマウスに於けるミトコンドリア由来アポトーシス機構. 第 27 回神経科学会・第 47 回日本神経化学会大会. 大阪. 9.21-23, 2004
41. 八谷如美, 山田真紀子, 渡邊光太, 定塚昌子, 逆瀬川裕二, 金子清俊. プリオン蛋白質過剰発現によるミトコンドリア由来神経細胞死機構. 第 77 回日本生化学会大会. 横浜. 10.13-16, 2004
42. 金子清俊, 山田真紀子, 定塚昌子, 大久保卓也, 逆瀬川裕二, 八谷如美. プリオン蛋白質過剰発現老齢トランスジェニックマウスにおけるミトコンドリア由来神経細胞死. 第 77 回日本生化学会大会. 横浜. 10.13-16, 2004
43. 逆瀬川裕二, 岸田日帯, 渡邊光太, 八谷如美, 金子清俊. リコンビナントプリオン蛋白質のドミナントネガティブ効果による異常感染型プリオン感染機構の解析. 第 77 回日本生化学会大会. 横浜. 10.13-16, 2004
44. 岩浪直子, 三川潮, 西道隆臣, 金子清俊. プリオン結合物質によるプリオン蛋白構造変換阻害効果. 第 77 回日本生化学会大会. 横浜. 10.13-16, 2004
45. 池袋一典, 野間崇央, 早出広司, 大久保卓哉, 逆瀬川裕二, 八谷如美, 金子清俊. 組織切片中の標的タンパク質に結合するアプタマーの探索法の開発. 第 27 回日本分子生物学会年会. 神戸. 12.8-11, 2004
46. 田村美子, 功刀浩, 金子清俊, 北條浩彦. DNA メチル化によるエピジェネティックなヒトゲノム修飾に関する研究. 第 27 回日本分子生物学会年会. 神戸. 12.8-11, 2004
47. 大西悠亮, 小見和也, 田村美子, 徳永勝士, 金子清俊, 北條浩彦. 対立遺伝子特異的 RNAi 効果の簡易評価システム. 第 27 回日本分子生物学会年会. 神戸. 12.8-11, 2004

〔知的所有権の取得状況〕

なし

Unfoldin has a robust protein-unfolding activity



プリオン病モデルマウスとヒト・プリオン伝達試験 (3)

班 員：毛利資郎 (九州大学・大学院医・実験動物学)
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)
研究協力者：松浦裕一 (九州大学・大学院医・実験動物学)
研究協力者：北本哲之 (東北大学・大学院医・創生応用医学)

[研究要旨]

われわれが開発したヒト/マウスキメラ型遺伝子ノックインプリオン病モデルマウス (Ki-ChM) はヒト・プリオンに対して高い感受性を示し、濾胞樹状細胞 (FDC) における異常プリオン蛋白の早期沈着を検出することによって新しいバイオアッセイ法を提供した。しかしながら、Ki-ChM では伝達できないヒト由来プリオンがあることも判明した。それらのうち、硬膜移植後 CJD プラーク型プリオンについては Ki-Hu129M4R の過剰発現系により感染性を証明した。本年度は、ヒトのプリオン蛋白遺伝子多型であるコドン 129 がバリン・ホモタイプ 2 型 (VV2) の患者由来プリオンを新しく作製した 129 番目のコドンがバリンの全ヒト型プリオン蛋白質を産生する遺伝子改変マウス (Ki-Hu129V) を用いて伝達試験をおこなった。

その結果、FDC に早期に異常なプリオン蛋白沈着が認められ、脳内接種による伝達も確認された。さらに、ヒト VV2 型プリオンの分子生物学的特性や病理組織学的所見も伝達されていることが判明した。

Estimation for a novel knock-in mouse as rapid and sensitive bioassay system for human-prions (3)
- transmission studies with sporadic CJD type 2 VV -

Shirou MOHRI¹, Tetsuyuki KITAMOTO², Ichiro MIYOSHI³ and Yuichi MATSUURA¹

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

² Division 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

³ Center for Experimental Animal Science, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

ABSTRACT

Our knock-in mice with human/mouse chimeric transgene (Ki-ChM) have provided a new detection system for infectivity to human prion that accumulation of abnormal prion protein could be detected in follicular dendritic cells in spleen of the mice on the early stage of infection. It was easy to transmit to chimeric mice and detect abnormal prion protein after intraperitoneal or intracerebral inoculation with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD) type 1 possessing codon 129 methionine homozygosity (MM1). However, any transmission to chimeric mice has not succeeded and any accumulation of abnormal prion protein has not been able to be detected after inoculation with type 2 possessing codon 129 valine homozygosity (VV2). To detect infectivity of sCJD-VV2, another knock-in mice expressing full length human prion gene (Ki-Hu129V) were employed in transmission. As a result of inoculation into peritoneal cavity or brain, it came to be able to detect the abnormal prion protein at FDCs or in the brain of Ki-Hu129V mice with certain clinical signs, which had not been observed in Ki-ChM mice. Additionally, some features of sCJD-VV2 were conserved in the transmitted mice.

[目的]

ヒト/マウスキメラ型遺伝子ノックインプリオン病モデルマウス (Ki-ChM) はヒト・プリオンに対して高い感受性を示し、濾胞樹状細胞 (FDC) における異常プリオン蛋白の早期沈着が検出できることを報告した¹⁾。しかしながら、CJD 患者由来の 129 バリントタイプ 2 型 (VV2) プリオンの伝達試験では FDC における異常プリオン蛋白質の沈着も起こらず、脳内接種での伝達も確認できなかった²⁾。

そこで、ヒト VV2 プリオンの感染性を証明するために、129 番目塩基がバリンあるいはメチオニンの全ヒト型プリオン蛋白質を産生する新たなノックインマウスを用いて伝達試験を行った。

[材料と方法]

1. ノックインマウス

遺伝子改変プリオン病モデルマウスとして、第3エクソンの SmaI サイト以降の ORF が全てヒト型プリオン蛋白遺伝子でコドン 129 がバリン (Ki-Hu129V)、もしくはメチオニン (Ki-Hu129M) となるように設計された相同組換え遺伝子を有している全ヒト型のプリオン蛋白質を発現するノックインマウスを作製した

3). Ki-Hu129V マウスは同じ構造の遺伝子を導入されたトランスジェニック (Tg) マウスと交配してヒト・プリオン蛋白質遺伝子過剰発現のダブルミュータント (Ki・Tg-Hu129V#139) を作製し用いた。

2. ヒト・プリオンの接種

CJD-VV2 型患者由来のヒト・プリオン (10%脳乳剤) をノックインマウスの腹腔内接種 (IP) 50 μ l、もしくは脳内接種 (IC) 20 μ lをおこなった。対照として CJD-MM1 型患者由来プリオンも同様に接種した。

IP は 75 日後に、IC 後は何らかの臨床症状でマウスプリオン病と判断されるか、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それぞれ安楽死させた。安楽死後の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⁴⁾ による前処理の後、一次抗体として抗 PrP N 末ウサギ血清を用いた。

3. ウェスタンブロット

接種用に調整された 10%ホモジネート脳乳剤の上清をそれぞれ 2%サルコシルで処理し、プロテアーゼ K にて 37°C60 分処理の後、SDS ローディングバッファーを用いて SDS-PAGE をおこなった。ゲルは PVDF にブロッティングし、一次抗体としてマウスモノクローナル抗体 3F4 (Signet) を用いて ECL plus (Amersham Biosciences) にて検出した。

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、Affected animals とし、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。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては、九州大学大学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プリオン専用の感染動物実験室でおこなった。

[結果]

表 1 に示されるように、MM1 ヒトプリオンはキメラ型ノックインマウス Ki-ChM によく反応し、腹腔内接種 75 日後に FDC において異常なプリオン蛋白質の沈着が全てのマウスに認められたが、VV2 ヒトプリオンではまったく認められなかった。脳内接種でも MM1 ヒトプリオン接種後、平均 151 日で全頭発症するのに対して、VV2 ヒトプリオンは最長 842 日経過しても感染は成立しなかった。反対に、全ヒト型ノックインマウス、Ki-Hu129V では VV2 ヒトプリオン腹腔内接種 75 日後の FDC における異常なプリオン蛋白質沈着は全頭 (7/7) 陽性であったが、MM1 ヒトプリオン接種例では僅か 1 頭 (1/4) に陽性が認められたに過ぎなかった。脳内接種でも VV2 ヒトプリオンは接種後平均 312 日で全頭発症した。MM1 ヒトプリオンについては現在観察中である。また、過剰発現系遺伝子改変マウス Ki・Tg-Hu129V#139 においても同様に、腹腔内接種 75 日後の FDC における異常プリオン蛋白質沈着は VV2 ヒトプリオン接種例では全頭 (3/3) 陽性であったが、MM1 ヒトプリオン接種では僅か 1 頭 (1/3) に陽性が認められたのみであった。一方、脳内接種では VV2 ヒトプリオンは最短 167 日、平均 184 日で全頭発症し、MM1 ヒトプリオンでも平均 288 日で全頭発症した。

プロテアーゼ K 処理後のウェスタンブロットで、タイプ 1 (MM1) ヒトプリオンを接種されたマウスでは接種材料と同じタイプ 1 の分子サイズを、タイプ 2 (VV2) ヒトプリオンを接種されたマウスではタイプ 2 の分子サイズを示した。また、過剰発現系マウスでは異常プリオン蛋白質の蓄積量が少ないことが示された (図 2)。

[考察]

ヒトの多型であるコドン 129 バリンヒトプリオン蛋白質遺伝子を導入された遺伝子改変モデルマウスへの伝達試験で CJD-VV2 ヒトプリオンが容易に伝達できるようになった。しかし、コドン 129 メチオニンのヒトプリオン蛋白質遺伝子導入マウスではキメラ型、全マウス型ともに CJD-VV2 ヒトプリオンに対して全く感受性が認められなかった。それに対して、CJD-MM1 ヒトプリオンはコドン 129 メチオニン型マウスには感受性が認められた。これらはコドン 129 の多型はプリオン伝達の要因の一つであることを示している。したがって、今後、プリオンのヒトに対する安全性を調べるためのバイオアッセイには Ki・Tg-Hu129V 系のマウスを加える必要があると思われた。

CJD-VV2 ヒトプリオンを脳内接種されたノックインマウス ki-Hu129V が安楽死されるまでの潜伏期間は平均 312 日であるのに対して、同じコンストラクトの過剰発現系では平均 184 日で発症した。これは全ヒト型プリオン蛋白質遺伝子導入マウスでは過剰発現により感受性が高くなることを示している。

プロテアーゼ K 処理後のウェスタンブロットで 2 型を示すヒトプリオンは 1 型ヒトプリオンに比して分子サイズが小さくなることが報告されているが、われわれの接種材料でも同様であり、しかも、この分子構