

mutation induces mitochondria-mediated apoptosis and PrP-containing deposits *in vitro*. 第78回日本生化学会大会. 神戸, 10.19-22, 2005.

- 17) 八谷如美, 大久保卓哉, 小塚芳道, 逆瀬川裕二, 金子清俊: Over a hundredfold increase in immunoblot signals of laser-microdissected inclusion bodies with an excessive aggregation property by Unfoldin/oligomeric Aip2p. 第78回日本生化学会大会. 神戸, 10.19-22, 2005.

- 18) 大久保卓哉, 逆瀬川裕二, 有馬邦正, 山田光則, 水澤英洋, 八谷如美, 金子清俊: ピック小体の主要構成蛋白は異常リン酸化タウ69kDaである. 第28回日本分子生物学会年会. 福岡, 12.7-10, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

細胞内に局在する PrP^C の解析

分担研究者：堀内 基広 北海道大学・大学院獣医学研究科

研究要旨

正常型プリオン蛋白質(PrP^C)は glycosyl-phosphatidyl-inositol(GPI)を介して細胞表面に発現する GPI 結合型膜糖蛋白質である。PrP^Cは、銅イオンの代謝、抗酸化機構、神経伝達などに関与することが示唆されているが、機能はよく判っていない。我々は以前、マウス PrP のアミノ酸(aa)147-151、および aa 219-229 を認識する抗 PrP モノクローナル抗体(mAb)が、マウス神経芽腫細胞 Neuro2a の細胞表面の PrP^Cとは反応しないが、細胞内に存在する PrP^C(IC-PrP^C)と反応することを見出した。そこで本研究では、この IC-PrP^Cの細胞生物学的性状について解析した。各種培養細胞で、mAb32(aa 147-151)および mAb 147(aa219-229)により検出される IC-PrP^Cを調べた結果、Neuro2a 以外にはマウス神経芽腫細胞 NB41A3 およびラット副腎クロム親和性細胞 PC12 で、IC-PrP^Cが検出された。Neuro2a をレチノイン酸で刺激した場合、IC-PrP^Cは神経突起様の細胞伸長に沿って検出された。PC12 を神経成長因子(NGF)で刺激した場合も、IC-PrP^Cは神経突起の伸長に沿って検出された。また、IC-PrP^Cは NGF に応答する PC12 サブクローンで検出されたが、NGF 非応答性の PC12 サブクローンでは検出されなかった。用いた NGF 非応答性の PC12 サブクローンは全て、NGF レセプターである成熟型 TrkA を発現していなかった。IC-PrP^Cは、ラットの副腎髄質、座骨神経でも検出された。また、中枢神経系組織では、大脳皮質、海馬、小脳には存在せず、延髄の特定の領域で検出された。以上の結果から、IC-PrP^Cが特定の神経線維の伸長や維持などに関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

正常型プリオン蛋白質(PrP^C)は glycosyl-phosphatidyl-inositol(GPI)を介して細胞表面に発現する GPI 結合型膜糖蛋白質である。PrP^Cは、銅イオンの代謝、抗酸化機構への関与、神経伝達への関与などに関与することが示唆されているが、機能はよく判っていない。我々は、以前に、マウス PrP のアミノ酸(aa)147-151、および aa 219-229 を認識する抗 PrP モノクローナル抗体(mAb)が、マウス神経芽腫細胞

Neuro2a の細胞表面の PrP^Cとは反応しないが、細胞内に存在する PrP^Cと反応すること、この PrP^Cが粗面小胞体やゴルジ装置とは共局在しないことを見出した。このことは、細胞膜に発現する PrP^Cとは構造が異なる PrP^Cが細胞内に存在することを示唆している。GPI 結合型蛋白質として膜系での機能が注目されてきたが、細胞内に存在する PrP^C分子種(本報告書では細胞内 PrP^C(IC-PrP^Cと呼ぶ))が、何らかの生理機能を担っている可能性も否定できない。そこ

で本研究では、この IC-PrPC の細胞生物学的性状について解析した。

B. 研究方法

マウス神経芽腫細胞 Neuro2a および NB41A3、視床下部由来 GT1-7、筋芽細胞 G8 および NOR10、肝細胞 NMuLi、副腎皮質由来細胞 Y1、胚性癌腫細胞 P19、およびラットクロム親和性細胞腫 PC12 を実験に使用した。

Neuro2a は 20 μ M のレチノイン酸(RA)存在下で 2 日間培養して分化誘導した。PC12 は 20ng/ml の NGF 存在下で 2 日間培養して分化誘導した。P19 は、1 μ M の RA 存在下で 3 日間培養した後、細胞凝集塊を形成させ、その後、RA 非存在下で培養することで分化誘導を行った。

5 週齢の Jcl/SD 雌ラットの脳、副腎、座骨神経を OCT compound で凍結包埋し、クリオスタットで 10 μ m の凍結切片を作製した。

抗 PrPmAb として、mAb110(aa 59-90), mAb31C6(aa 143-149), mAb 32(aa 147-151), および mAb 147(aa 219-229)を用いた。また、抗 MAP-2mAb(Sigma)および抗 TrkA 抗体 (Chemicon) を使用した。二次抗体として Alexa-488 標識抗体を使用して間接蛍光抗体法 (IFA) を実施した。共焦点レーザー顕微鏡

(Nikon CZ-1) を用いて蛍光像を観察した。

蛋白質分解酵素阻害剤を含む lysis butffer (0.5% Triton-X 100, 0.5% Sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl(pH 7.5)) で細胞を溶解し、低速遠心により核を除いた。その後、20,000xg で遠心した上清を PrPC および TrkA の検出に使用した。

SDS-PAGE は NuPAGE 12% Bis-Tris gel (Invitrogen) を用いた。ウエスタンブロットはウエットタイプのブロッティング装置を用いて行った。バンドは化学発光により検出した。検出には LAS-3000 lumino-image analyzer (Fuji film) を使用した。

C. 研究結果

mAb110 で検出される PrPC は使用したすべての細胞で発現していた。一方、mAb 32 および 147 で検出される IC-PrPC は、Neuro2a に加えて、マウス神経芽腫細胞 NB41A3、およびラットクロム親和性細胞腫 PC12 で検出された (図 1)。

神経系由来の細胞で IC-PrPC が検出されたことから、分化誘導により IC-PrPC の染色像が変化するか、および神経細胞への分化にともない IC-PrPC が出現するかについて検討した

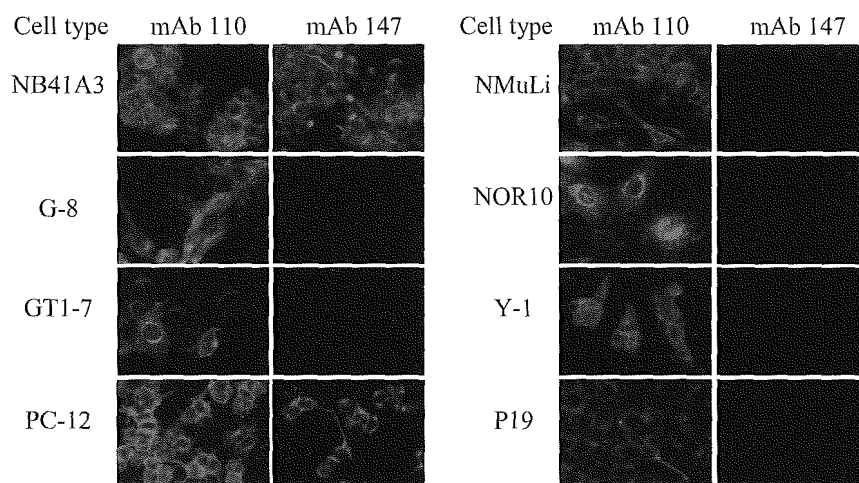


図 1 各種培養細胞における IC-PrPC の存在

細胞膜上に発現する PrPC と反応する mAb 110 と IC-PrPC と反応する mAb 147 を用いて IFA を行った。mAb 32 の反応性は mAb 147 と同様であった (結果は示さず)。

(図 2)。Neuro2a を RA で刺激した場合、IC-PrPC は細胞内と神経突起様の突起内に検出された。NGF により神経突起を伸長した PC12 でも、IC-PrPC は細胞内と伸長した神経突起内で検出された。一方、IC-PrPC 陰性の P19 は RA 刺激により MAP-2 陽性細胞が出現しても、IC-PrPC 陽性細胞は出現しなかった。さらに、当教室で作出した NGF 応答性 PC12

サブクローン 3 株および非応答性サブクローン 4 株を mAb32 および mAb147 で染色した結果、IC-PrPC は NGF 応答性 PC12 サブクローンにのみ存在した(図 3)。PC12 サブクローンにおける NGF レセプター TrkA の発現を WB にて調べた結果、NGF 応答性 PC12 サブクローンでは、140 および 110kDa の糖鎖付加した成熟型 TrkA が発現しているが、NGF 非応答性

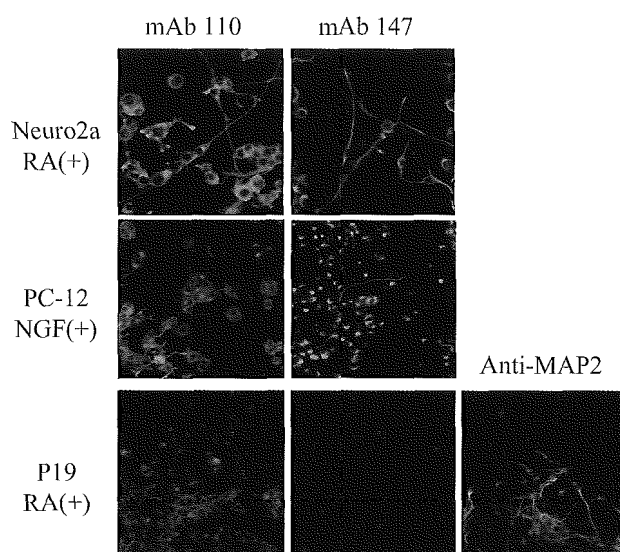


図 2 分化誘導後の IC-PrPC の局在

Neuro2a, PC12, および P19 を分化誘導後に、mAb 110 と mAb 147 を用いて IFA を行った。

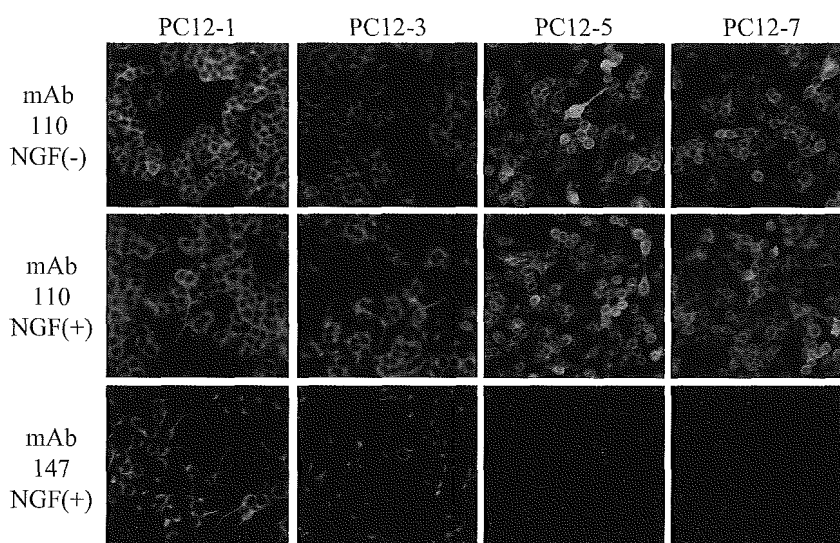


図 3 PC12 サブクローンにおける IC-PrPC の存在

NGF 応答性の PC12-1 および PC12-3、NGF 非応答性の PC12-5 および PC12-7 を、mAb 110 と mAb 147 で染色した。mAb 147 で検出される IC-PrPC は NGF 応答性 PC-12 サブクローンでのみ検出された。他の NGF 応答性サブクローン 2 株、非応答性サブクローン 1 株も同様の反応性を示した。

PC12 サブクローンでは糖鎖付加した TrkA が発現していないことが判明した(図 4)。生物学的な関連は不明であるが、IC-PrPC の存在と、成熟型 TrkA の存在が一致した。

IC-PrPC が、動物組織に存在するかを検討す

るために、ラット組織の凍結切片を用いて、IFA を行った(図 5)。副腎髄質、座骨神経で、IC-PrPC が検出されたが、その分布は、mAb110 で検出される通常の PrPC の分布とは異なっていた。脳では mAb で検出される通常の PrPC

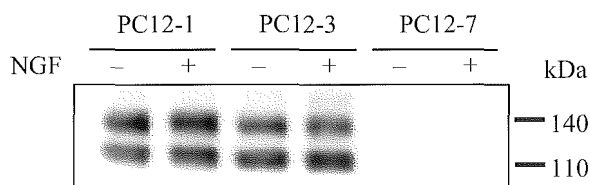


図 4 PC12 サブクローンにおける成熟型 TrkA の発現

NGF 応答性の PC12-1 および PC12-3、NGF 非応答性の PC12-7 における成熟型 TrkA の発現をウエスタンブロットにより調べた。他の NGF 応答性サブクローン 2 株、非応答性サブクローン 2 株も同様の反応性を示した。

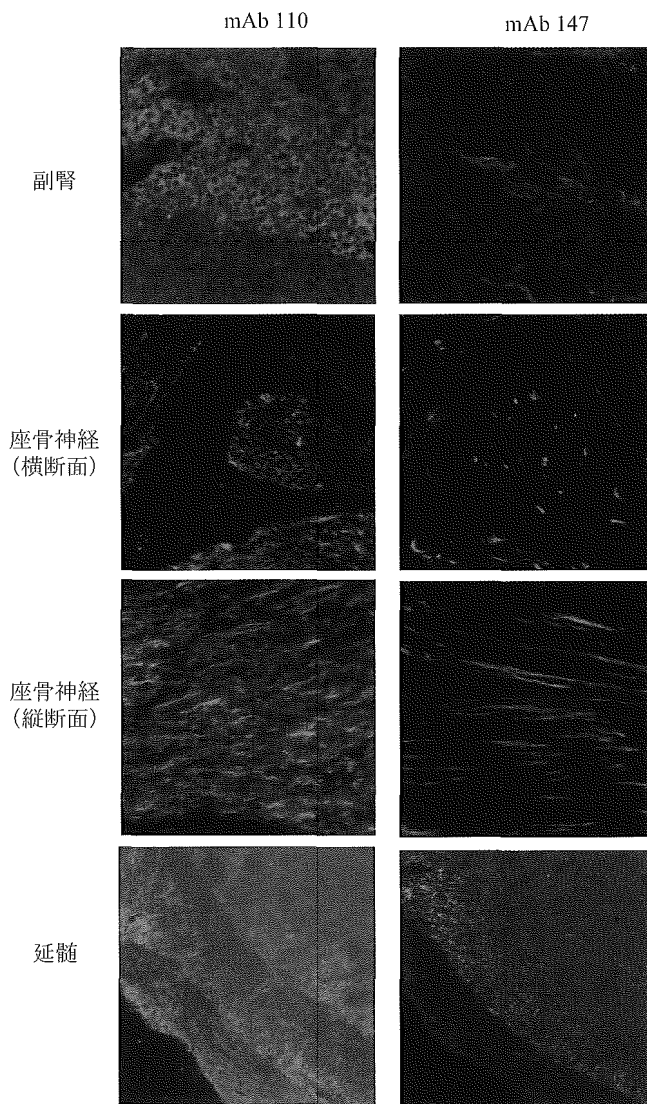


図 5 ラット組織における IC-PrPC の存在

ラットの副腎、座骨神経、および脳の凍結切片を作製し IFA を行った。

は脳全体で発現が認められた。対照的に IC-PrP^C は延髄の一部で検出されたが、大脳皮質、海馬、小脳では検出されなかった。

D. 考察

PrP^C は GPI 結合型膜蛋白質であり、細胞膜上で何らかの生理機能を果たしていると考えられている。IC-PrP^C は、抗体の反応性から、細胞膜上に発現する PrP^C とは構造が異なる。特定の神経系由来の培養細胞でのみ IC-PrP^C が検出されたこと、神経突起(様)の細胞伸長に一致して突起内にも存在したことから、IC-PrP^C は特定の神経系の細胞や組織で、何らかの生理機能を担っている可能性がある。興味深いことに、IC-PrP^C は NGF 応答性の PC12 サブクローンには存在するが、NGF 非応答性の PC12 サブクローンには存在しなかった。本研究では、IC-PrP^C と TrkA の直接的な相互作用については検討していないが、PC12 サブクローンでは、IC-PrP^C と成熟型 TrkA の存在が一致することから、両者の間には、直接あるいは間接的な関連があるかもしれない。また、IC-PrP^C はラットの延髄、副腎、座骨神経からも検出されたことから、IC-PrP^C は培養細胞におけるアーティファクトではないことが確認できた。IC-PrP^C の染色像は、通常の PrP^C の染色像と大きく異なっていた。座骨神経では、一部の神経束の走行に一致した染色像を示した。また、脳組織では、大脳皮質、海馬、小脳では検出されず、延髄の特定の部位でのみ IC-PrP^C が検出されたことから、特定の神経細胞や神経線維で、IC-PrP^C が何らかの生理機能を有している可能性が考えられる。IC-PrP^C が検出される領域の組織構築などを PrP 欠損マウスで詳細に検討することで、何らかの異常が認められる可能性もある。この点は、今後の検討課題である。

IC-PrP^C が PrP^{Sc} の産生に影響するかに興味を持たれるが、プリオン増殖可能な GT1-7 で

は IC-PrP^C が検出されていないことから、細胞におけるプリオンの増殖とは関連しないと考えられる。

E. 結論

マウス神経芽腫細胞 Neuro2a および NB41A3、およびラット副腎クロム親和性細胞 PC12 で、通常の PrP^C とは性質が異なる IC-PrP^C が細胞内に存在した。神経系由来の培養細胞を分化させた場合、IC-PrP^C は神経突起(様)の細胞伸長に沿って突起内にも検出された。PC12 由来サブクローンにおける IC-PrP^C の発現は、サブクローンの NGF 応答性および成熟型 TrkA の発現と一致していた。IC-PrP^C は、ラットの副腎髄質、座骨神経でも検出された。また、中枢神経系組織では、大脳皮質、海馬、小脳には存在せず、延髄の特定の領域で検出された。以上は、IC-PrP^C が特定の神経線維の伸長や維持などに関与している可能性が示唆するものと考えられた。

F. 健康危険情報

本研究では、感染性病原体等を使用していない。また、研究期間を通じて、健康に問題を生じた事例は発生していない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Furuoka H, Yabuzoe A, Horiuchi M, Tagawa Y, Yokoyama T, Yamakawa Y, Shinagawa M, Sata T : Effective antigen-retrieval method for immunohistochemical detection of abnormal isoform of prion proteins in animals. *Acta Neuropathol.* **109** : 263-271, 2005.
- 2) Kataoka N, Nishimura M, Horiuchi M, Ishiguro N : Surveillance of chronic wasting disease in sika deer, *Cervus nippon*, from Tokachi district in Hokkaido.

- J Vet Med Sci. **67** : 349-351, 2005.
- 3) Kurosaki Y, Ishiguro N, Horiuchi M, Shinagawa M : Polymorphisms of caprine PrP gene detected in Japan. J Vet Med Sci **67** : 321-323, 2005.
 - 4) Inanami O, Hashida S, Iizuka D, Horiuchi M, Hiraoka W, Shimoyama Y, Nakamura H, Inagaki F, Kuwabara M : Conformational change in full-length mouse prion : A site-directed spin-labeling study. Biochem. Biophys Res Commun. **335** : 785-792, 2005.
 - 5) Horiuchi M, Furuoka H, Kitamura N, Shinagawa M : Gut-associated lymphoid tissues are essential for prion infection via the oral route. Jpn J Vet Res (in press).
 - 6) 堀内基広 : 異常型プリオン蛋白質の生合成と伝達 膜 **30**, 78-83, 2005
 - 7) 堀内基広 : BSE 診断法の開発と現状 Virus Report **2**, 20-27, 2005
 - 8) 堀内基広 : 人獣共通感染症としてのプリオン病 ウイルス **55**, 45-55, 2005
 - 9) 堀内基広 : 動物由来感染症としてのプリオン病 日本臨床 **63**, 2213-2220, 2005
2. 学会発表
 - 1) 金チャンラン, 堀内基広 : 培養細胞における正常プリオン蛋白質の新たな細胞内局在 2005年プリオン研究会(2005, 8/25-26, 山形)
 - 2) 瓜生匡秀, 堀内基広 : マウス神経芽腫細胞 Neuro2a のプリオン感受性は PrP^C 以外の因子により規定される 2005年プリオン研究会(2005, 8/25-26, 山形)
 - 3) 堀内基広, 品川森一 : 蛍光相関分光法による未変性条件下での異常型プリオン蛋白質の検出 第 53 回日本ウイルス学会(2005, 11/20-22, 横浜)
 - 4) Kim C-L, Shinagawa M, Maeda M, Horiuchi M : Unique intracellular PrP^C localization in mouse neuroblastoma cells and NGF-responsive PC-12 cells. The 9th International Symposium for Zoonosis Control(2004, 8/29, Sapporo, Japan)
 - 5) Yamaguchi S, Uzawa T, Nishida Y, Horiuchi M : Inhibition of PrP^{Sc} by artificially-sulfated glycosides and their polymers. The 9th International Symposium for Zoonosis Control(2004, 8/29, Sapporo, Japan)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

アポトーシス抑制におけるプリオン蛋白と STI1 蛋白に関する研究

分担研究者：佐伯 圭一 東京大学・大学院農学生命科学研究科・応用免疫学

研究要旨

プリオン蛋白(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。本研究ではプリオン蛋白と相互作用すると考えられているストレス誘導蛋白：stress-inducible protein 1(STI1)と SOD 活性およびアポトーシス抑制に関して解析を行なった。また異種動物由来 PrP 再発現におけるアポトーシス抑制に関して解析を行なった。PrP/STI1 相互作用を合成ペプチドで阻害することにより、PrP 非発現細胞と比較して PrP 再発現細胞の SOD 活性およびアポトーシス抑制の低下が認められた。ハムスターおよびウシ PrP を再発現させた細胞においてはマウス PrP 再発現細胞で認められるアポトーシス抑制が認められなかった。これらの結果より、PrP によるアポトーシス抑制には同一種内の PrP/STI1 相互作用が重要であると考えられた。

A. 研究目的

PrP の機能解析にはプリオン蛋白遺伝子欠損マウス胎児脳の海馬領域より樹立した神経細胞株に PrP 遺伝子を再導入しアポトーシス抑制について解析を行う。今年度は PrP/STI1 相互作用について SOD 活性およびアポトーシス抑制能について解析を行なった。また、これまでマウス由来 PrP 遺伝子を用いて研究を行ってきたが、本研究ではさらにハムスター、ウシ由来の PrP 遺伝子を用い PrP 遺伝子欠損神経細胞に発現させることにより PrP の機能についてさらに多くの情報を得ることを目的とした。

B. 研究方法

PrP 遺伝子欠損細胞株について STI1 の発現をウエスタンブロット法を用いて解析した。PrP/STI1 複合体について PrP 非発現細胞(EM)および PrP 再発現細胞(PrP)から海面活性剤を用いて蛋白質を調整し、抗 PrP 抗体

(SAF32)を用いて免疫沈降を行なった。沈降物を抗 PrP 抗体および抗 STI1 抗体を用いてウエスタンブロット法にて解析した。PrP/STI1 相互作用に必要なアミノ酸領域に対する合成ペプチドを合成した(PrP(GAAAAGAVVGGLGGYMLGSA), STI1(ELGNDAYKKKDFDKAL)それぞれ PrP(113-132), STI1(230-245))。それらのペプチドを培地中に添加しアポトーシス誘導時における細胞傷害について Tetra Color One を用いて測定した。また、SOD 活性の変化について測定を行なった。

ハムスターおよびウシ PrP 遺伝子蛋白翻訳領域を組み換えレトロウイルスベクターに組み込んだ。組み換えレトロウイルスを用いて PrP 遺伝子欠損細胞に遺伝子導入し、薬剤選択を行なった後に、それぞれ PrP 再発現細胞を得た。それらの細胞株を用いて従来の方法に従い無血清下で誘導されるアポトーシスについて抑制能を解析した。抑制能の解析には断片化 DNA のゲ

ル電気泳動および ELISA を用いて解析した。細胞傷害については色素排除試験を行なった。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え操作およびウイルス取り扱いに関しては P2 実験施設内で行ない、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」および大学内規定を遵守して実施した。実験動物管理に関しては逃亡および感染事故防止処置のとられた飼育室および密閉個別ボックス式飼育装置内で行なった。

C. 研究結果

PrP 欠損細胞株および PrP 再発現細胞において STI1 が発現していることがウエスタンブロット法で確かめられた。PrP 再発現細胞を用いて PrP を免疫沈降した分画に STI1 が共沈降し

てきた。一方で PrP 欠損細胞を用いた PrP 免疫沈降の分画に STI1 が共沈降しなかったことより、PrP と STI1 が結合していることが確かめられた(図 1)。

血清除去によるアポトーシス誘導下における PrP、STI1、Cu/Zn SOD の変化を調べるためにウエスタンブロットを行なった(図 2)。PrP は主に細胞膜分画に認められた。血清除去後 0 時間および 6 時間後における PrP の量的変化は認められなかった(図 2 左から 5 レーン、7 レーン)。STI1 は PrP 非発現および再発現細胞において細胞膜分画および細胞質分画両方に認められたが、PrP 再発現化に伴って細胞膜分画に存在する STI1 のわずかな増加が認められた(図 2 左から 1 レーン、5 レーン)。血清除去後 6 時間後の STI1 には量的差は認められなかった。

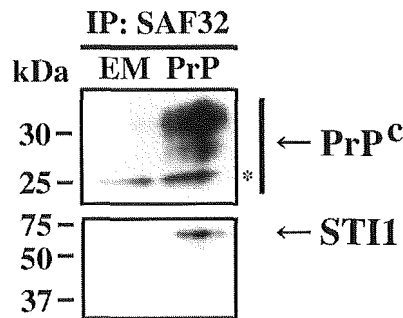


図 1 免疫沈降による PrP/STI1 複合体

免疫沈降物を抗 PrP 抗体(上図)および抗 STI1 抗体(下図)を用いてウエスタンブロットを行なった。PrP 非発現細胞(EM)および PrP 再発現細胞(PrP)。
※：沈降物に含まれる抗体のバンド

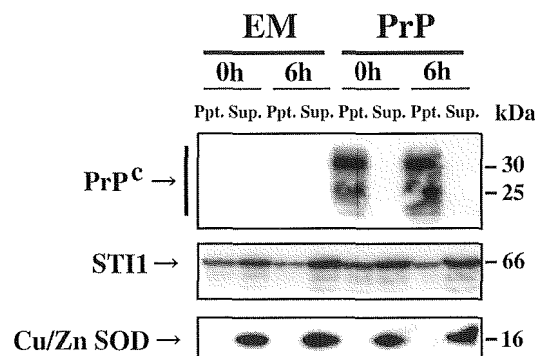


図 2 血清除去後 0 時間および 6 時間後の PrP、STI1 および Cu/ZnSOD の発現
PrP 非発現細胞(EM)および PrP 再発現細胞(PrP)。細胞膜分画 Ppt。細胞質分画 Sup。

Cu/Zn SOD は細胞質画分に主に認められ、PrP 非発現および再発現細胞において量的変化は認められなかった(図 2 左から 2 レーン、6 レーン)。また血清除去後においても量的変化は認められなかった(図 2 左から 4 レーン、8 レーン)。PrP の再発現に伴う SOD 活性の上昇が合成ペプチド PrP(113-132)および STI1(230-245)による PrP-STI1 相互作用の阻害によって影響を受けるのかを調べた(図 3)。PrP の再発現化に伴って従来申請者らが報告してきたように SOD 活性の上昇が認められた(図 3 左から 1、4)。培地中に合成ペプチド PrP(113-132)および STI1(230-245)を添加することにより、PrP 再発現細胞の SOD 活性がペプチド無添加の細胞と比較して有為な低下が認められた(図 3 左から 4-6)。一方、PrP 非発現細胞のペプチド添加に伴う SOD 活性には有為な変化は認めら

れなかった(図 3 左から 1-3)。

PrP の再発現に伴うアポトーシスの抑制が合成ペプチド PrP(113-132)および STI1(230-245)添加によって阻害されるかを断片化 DNA の比較および細胞傷害測定で調べた結果、いずれのペプチド添加によっても細胞死抑制阻害が起こることが認められた(結果未表示)。

異種動物由来 PrP 発現化に伴うアポトーシス抑制効果を調べるために、PrP 遺伝子欠損細胞にハムスターおよびウシ由来 PrP を発現させた細胞を樹立した。それらの細胞を血清存在下および血清非存在下で培養を行なった後、0、12、24 時間後の断片化 DNA をアガロース電気泳動法によって解析した(図 4)。従来の申請者らの報告のとおり、マウス PrP を発現させた細胞の DNA 断片化は PrP 非発現細胞に比べて抑制されていた。しかしながら、ハムスターおよび

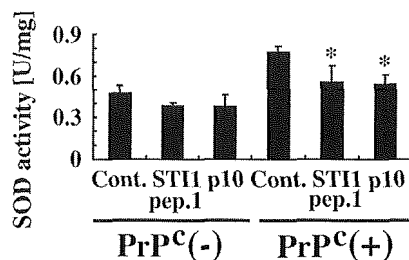


図 3 阻害ペプチド添加による SOD 活性の低下

PrP 非発現細胞 : PrP^C(-)、PrP 再発現細胞 : PrP^C(+)。
Cont : ペプチド無添加、STI1 pep.1 : STI1(230-245)添加、
p10 : PrP(113-132)添加、*p<0.01

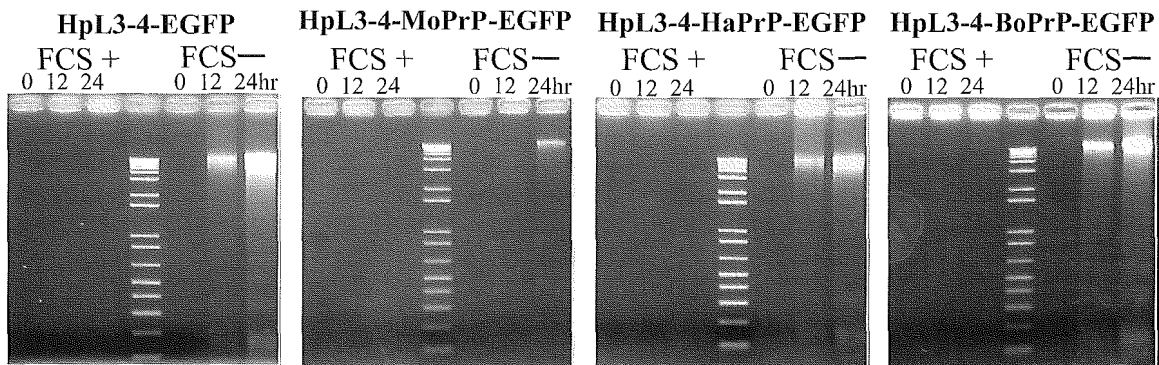


図 4 ハムスターおよびウシ PrP 再発現細胞におけるアポトーシス抑制能

PrP 非発現細胞: HpL3-4=EGFP、マウス PrP 再発現細胞: HpL3-4-MoPrP-EGFP、
ハムスター PrP 再発現細胞 : HpL3-4-HaPrP-EGFP、ウシ PrP 再発現細胞 :
HpL3-4-BoPrP-EGFP、FCS+ : 血清添加培地 FCS- : 血清無添加培地。血清無添
加培地置換後 0、12、24 時間後の断片化 DNA を電気泳動した。

ウシ PrP 発現細胞の断片化 DNA は PrP 非発現細胞と比較して大きな差は認められなかった。色素排除試験においてもマウス PrP 再発現細胞は PrP 非発現細胞と比較して染色陽性細胞が有為に少ないが、ハムスターおよびウシ PrP 発現細胞は PrP 非発現細胞と比較してむしろ増加傾向が認められた(結果非表示)。これからの結果からマウス由来細胞に異種動物由来であるハムスターおよびウシ PrP を発現させてもアポトーシス抑制効果が認められなかった。

D. 考察

PrP 再発現に伴う SOD 活性の上昇には PrP-STI1 相互作用が必要であると考えられた。アポトーシス誘導時における阻害ペプチドの影響を調べた結果、ペプチド添加時にアポトーシス抑制の低下が認められたことより、PrP-STI1 相互作用がアポトーシス抑制に重要な働きを及していると考えられた。PrP106-126 ペプチドが神経細胞毒性をもっていることは知られている(Forioni G. et al. Nature, 1993)。PrP は 113-132 のアミノ酸残基を介して STI1 と相互作用していると考えられ、PrP106-126 ペプチドとは領域的に重なっていることから、PrP106-126 ペプチドが PrP/STI1 相互作用を阻害し、結果として神経細胞毒性を有しているかもしれない。また、いくつかの PrP106-132 をエピトープとする抗体が PrP の神経細胞生存を阻害することが知られている。これらの結果においても PrP/STI1 相互作用が関係しているかもしれない。

本研究条件下では、ハムスターおよびウシ PrP はアポトーシス抑制効果を認めるところではなかった。PrP113-128 のアミノ酸領域はマウス、ハムスター、ウシ PrP 間で違いはない。しかし、そのすぐ上流である PrP109-112 ではマウスが LKHV であるのに対してハムスター PrP は MKHV であり、ウシ PrP は MKHM である。STI1 との相互作用をする上でこれらの

アミノ酸の違いが影響しているかもしれない。そのことを確認するため、現在マウス PrP に点突然変異を導入し解析をしている。また、ハムスターおよびウシから STI1 をクローニングし解析を進める予定である。

E. 結論

PrP 再発現に伴う SOD 活性の上昇およびアポトーシス抑制には PrP-STI1 の相互作用が必要であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakudo A, Lee DC, Nakamura I, Taniuchi Y, Saeki K, Matsumoto Y, Itohara S, Ikuta K, Onodera T : Cell-autonomous PrP-Doppel interaction regulates apoptosis in PrP gene-deficient neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **333**(2) : 448-454, 2005
- 2) Vassallo N., Herms J, Behrens C, Krebs B, Saeki K, Onodera T, Windl O, Kretzschmar HA : Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by cellular prion protein and its role in cell survival. *Biochem Biophys Res Commun.* **332**(1) : 75-82, 2005
- 3) Shyu WC, Chen CP, Saeki K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Onodera T, Ding DC, Chiang MF, Lee YJ, Lin SZ, Li H : Hypoglycemia enhances the expression of prion protein and heat-shock protein 70 in a mouse neuroblastoma cell line. *J Neurosci Res.* **80**(6) : 887-894, 2005
- 4) Inoue Y, Yamakawa Y, Sakudo A, Kinumi T, Nakamura Y, Matsumoto Y, Saeki K, Kamiyama T, Onodera T, Nishijima M : Infection route-independent accumulation of splenic abnormal prion protein. *Jpn J*

Infect Dis **58**(2) : 78-82, 2005

- 5) Sakudo A, Lee DC, Lee 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**(1) : 14-19, 2005
- 6) 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**(3) : 600-606, 2005

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

オクタペプチド領域はプリオン蛋白の抗神経変性作用に必要でない

分担研究者：坂口 末廣 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染分子病態学
研究協力者：吉川 大介 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染分子病態学
研究協力者：山口 尚宏 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染分子病態学
研究協力者：片峰 茂 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染分子病態学

研究要旨

正常プリオン蛋白(PrP^C)は、プリオン蛋白類似蛋白(PrPLP/Dpl)の神経変性作用と機能的に拮抗し、マウス小脳プルキンエ細胞が変性死を起こすのを防ぐ。以前我々は、N末アミノ酸23-88を欠くPrPには、このような神経保護作用がないことを報告した。今回我々は、N末アミノ酸25-50またはオクタペプチドリピート(OR)領域の51-90を欠損するPrPを発現するトランスジェニックマウスを作製した結果、両者ともPrPLP/Dplの神経変性作用を阻害することを見出した。また、PrPの1-124とPrPLP/Dplとを融合させたfuPrP-PrPLP/DplもPrPLP/Dplの神経変性作用を阻害した。これらの結果は、PrP^Cの神経保護作用にはORは必要でないことを明らかに示した。また、N末領域の25-50または51-91のどちらかが存在すれば、PrP^Cの神経保護作用には十分であることも明らかにした。

A. 研究目的

我々は、プリオン蛋白類似蛋白(PrPLP/Dpl)が正常プリオン蛋白(PrP^C)と機能的に拮抗し、マウス小脳プルキンエ細胞の変性死をきたすことを明らかにした。つまり、PrPLP/Dplはプルキンエ細胞において神経変性作用を有し、逆にPrP^Cは抗神経変性作用を有することが明らかとなった。また我々は、PrPに特異的に認められるオクタペプチドリピート(OR)領域を含むN末アミノ酸23-88を欠損するPrPはPrPLP/Dplの神経変性作用を阻害できないことを見出し、N末アミノ酸23-88にPrP^Cの抗神経変性作用に重要な領域が存在することを明らかにした。今回我々は、PrP^Cの抗神経変性作用に重要な領域を決定するために、N末領域をさらに欠損させたPrPを発現するトランス

ジェニック(tg)マウスを作製した。また、PrPのN末とPrPLP/Dplとの融合蛋白を発現するtgマウスも作製した。

B. 研究方法

コンストラクトの作製(図1)とtgマウスの作製 N末アミノ酸25-50を欠損するPrPdelN、51-90を欠損するPrPdelOR、及びPrPの1-124とPrPLP/Dplとを融合させたfuPrP-PrPLP/Dplを、ハムスターPrP遺伝子の翻訳領域と置換し作製した。ハムスターPrP遺伝子は既にコスミドベクターに挿入されているものを購入し用いた。これらのコンストラクトをC57BL/6マウスの受精卵の前核にインジェクションし、tg(PrPdelN)、tg(PrPdelOR)、及びtg(fuPrP-PrPLP/Dpl)マウスを作製した。

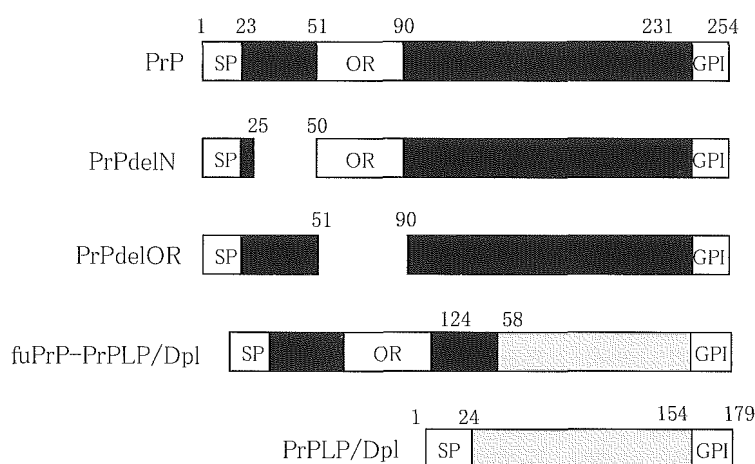


図 1 : tg(PrPdelN)、tg(PrPdelOR)、及び tg(fuPrP-PrPLP/Dpl) マウス作製に用いたコンストラクト。

SP : シグナルペプチド。OR : オクタペプチドリピート。GPI : GPI アンカーシグナル。

ダブル tg マウスの作製 tg(PrPdelN)、tg(PrPdelOR)、及び tg(fuPrP-PrPLP/Dpl) マウスを、Zrch I PrP^{-/-}バックグラウンドに PrPLP/Dpl を神経細胞に発現する tg(NSE-PrPLP/Dpl) 32PrP^{-/-}マウスと交配し、それぞれのダブル tg マウスを作製した。

免疫組織化学染色 マウスは、ジエチルエーテル吸入麻酔後、頸椎脱臼を試行し安楽死させた。その後、小脳をとりだし、抗カルビンディン抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。(倫理面への配慮)

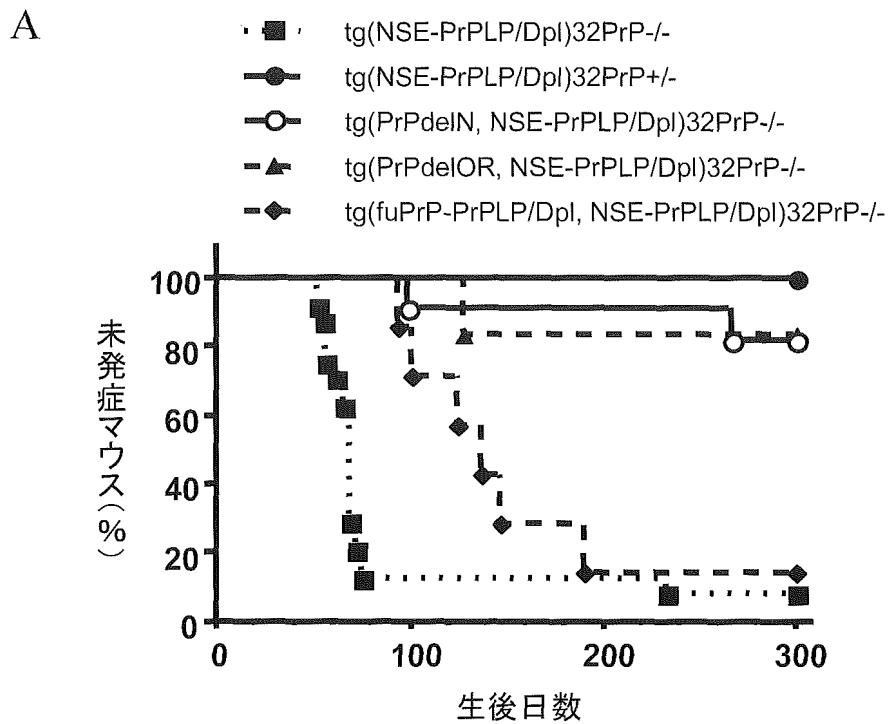
動物実験は長崎大学動物実験委員会の指針の範囲内で行われた。

C. 研究結果と考察

tg(PrPdelN)、tg(PrPdelOR)、及び tg(fuPrP-PrPLP/Dpl) マウスは、正常に生まれ正常に発育成長した。これらの tg マウスを、以前報告した tg(NSE-PrPLP/Dpl) 32PrP^{-/-}マウスと交配し、PrP^{-/-}バックグラウンドのダブル tg マウスを作製した。tg(NSE-PrPLP/Dpl) 32PrP^{-/-}マウスは、PrP^{-/-}バックグラウンドに PrPLP/Dpl を神経細胞特異的に発現するマウスで、生後 60 日ほどするとプルキンエ細胞死による失調性歩行を呈しはじめた(図 2A, B)。

しかし、PrP^{+/-}マウスでは、PrPLP/Dpl を神経細胞に異所性に発現させても、300 日の観察期間内には何ら神経学的異常を呈しなかった(図 2A, B)。これらの結果は、PrP^Cが PrPLP/Dpl の神経変性作用を阻害するという以前の我々の結果と一致した。

N 末アミノ酸 25-50 を欠損する PrPdelN 及び OR 領域に相当するアミノ酸 51-90 を欠損する PrPdelOR を導入すると、ほとんどの tg(NSE-PrPLP/Dpl) 32PrP^{-/-}マウスにおいて、プルキンエ細胞死が認められなかった(図 2A, B)。これらの結果は、PrP^Cの神経細胞保護作用には OR 領域は重要でないことを明らかに示した。PrP^Cの OR 領域は、銅イオンと結合し、結合した銅イオンを酸化ストレスの緩和に重要な酵素群に受け渡し活性化させることにより、PrP^Cの神経細胞保護作用に大きな役割を果たしていると考えられている。しかし今回の我々の結果は、PrP^Cによるプルキンエ細胞死のレスキューには酸化ストレス緩和以外の機能が関与している可能性を示した。また、アミノ酸 25-50 を欠損する PrPdelN もプルキンエ細胞死をレスキューした。以前我々は、N 末アミノ酸 23-88 にプルキンエ細胞変性死をレスキューするのに重要な領域が存在することを



B

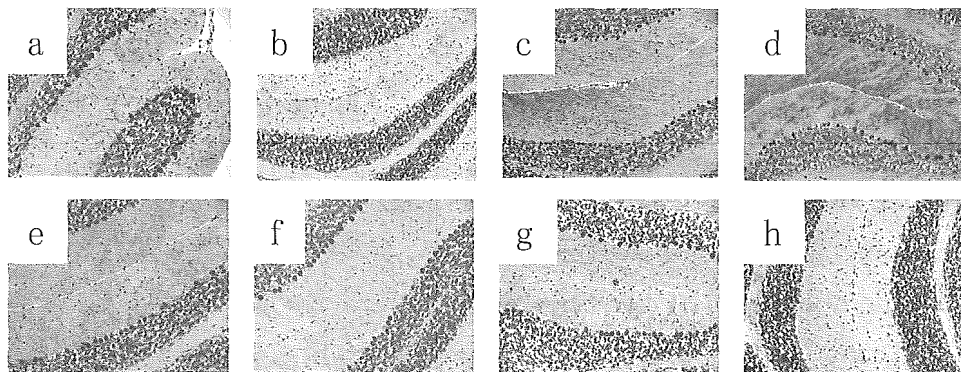


図2 ダブル tg マウスにおける失調性歩行(A)とプルキンエ細胞変性死(B)。
 プルキンエ細胞は抗カルビンディン抗体により染色。
 a, tg(NSE-PrPLP/Dpl)32PrP^{+/-} b, tg(NSE-PrPLP/Dpl)32PrP^{-/-}
 c: tg(PrP^{delN})PrP^{-/-} d, tg(PrP^{delN}, NSE-PrPLP/Dpl)32PrP^{-/-}
 e: tg(PrP^{delOR})PrP^{-/-} f, tg(PrP^{delOR}, NSE-PrPLP/Dpl)32PrP^{-/-}
 g: tg(fuPrP-PrPLP/Dpl)PrP^{-/-} h, tg(fuPrP-PrPLP/Dpl, NSE-PrPLP/Dpl)32PrP^{-/-}

示した。これらの結果を総合すると、N末アミノ酸 25-50 及び 51-90 のどちらか一方があれば、PrP^Cの神経細胞保護機能に十分であることを示した。またこれらの結果と一致して、PrPのN末アミノ酸 1-124 を PrPLP/Dpl に融合させた fuPrP-PrPLP/Dpl は PrPLP の神経毒性作用を抑制し、tg(NSE-PrPLP/Dpl)32PrP^{-/-}マウスのプルキンエ細胞死を不完全であるがレ

スキューした(図 2A, B)。fuPrP-PrPLP/Dpl の発現が低かったために、レスキューが不完全だったと考えられる。PrP^Cの神経保護機能の詳細なメカニズムは不明であり、さらに解析を続けていく必要がある。

E. 結論

PrP^Cの OR 領域は PrPLP/Dpl の神経変性作

用に拮抗するのに必要でない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamanaka H, Ishibashi D, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Nakamura R, Okimura N, Arakawa T, Tsuji T, Katamine S, Sakaguchi S : Enhanced mucosal immunogenicity of prion protein following fusion with B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. Vaccine (in press)
- 2) Sakurai-Yamashita Y, Sakaguchi S, Yoshikawa D, Okimura N, Masuda Y, Katamine S, Niwa M : Female-specific neuroprotection against transient brain ischemia observed in mice devoid of prion protein is abolished by ectopic expression of prion protein-like protein. *Neuroscience* **136** : 281-287, 2005
- 3) Sakaguchi S : Prion protein, prion protein-like protein, and neurodegeneration. *Neurodegeneration and Prion Disease* edited by David R. Brown. Springer, USA 167-193, 2005,
- 4) Arima K, Nishida N, Sakaguchi S, Shigematsu K, Atarashi R, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Yoon J, Watanabe K, Kobayashi N, Mouillet-Richard S, Lehmann S, Katamine S : Biological and biochemical characteristics of prion strains conserved in persistently-infected cell cultures. *J Virol*, **79** : 7104-7112, 2005

2. 学会発表

- 1) Sakaguchi S, Ishibashi D, Yamanaka H : Efficient Induction of Prophylactic antibodies against Prion Disease in Mice. 24th International Congress of

Chemotherapy. Symposium 34 : Emerging and re-emerging infectious diseases in the Western Pacific. Philippine International Convention Center, Manila, Philippine, 4-6 June, 2005

- 2) Sakaguchi S : Prion protein and prion diseases. 2005 Japan-America Frontiers of Engineering Symposium, San Jose, CA, November 3-5, 2005
- 3) Hashiguchi S, Kitamoto S, Sakamoto K, Ito Y, Nakashima T, Sasaki K, Gaikwad, JU, Akasaka K, Sakaguchi S, Katamine S, Sugimura K : Human antibodies specific to beta-sheet-rich isoform of human prion protein. PEGS: The Protein Engineering Summit, "Take Protein Engineering from Concept to Reality", Royal Sonesta Hotel, Cambridge, Massachusetts, May 16-20, 2005
- 4) 坂口末廣 : プリオン蛋白とプリオン病. 第20回日本環境感染学会総会 アフタヌーンセッション11 神戸 2005 2
- 5) 石橋大輔, 山中仁木, 片峰 茂, 坂口末廣 : 異種プリオン蛋白によるプリオン感染抑制効果. 第52回日本ウイルス学会学術集会 横浜 2005 11/20-22
- 6) 石橋大輔, 山中仁木, 坂口末廣 : 異種プリオン蛋白によるプリオン病の予防: プリオンワクチンの可能性. 第35回日本免疫学会学術集会, ワークショップ ウイルス感染とその制御 パシフィコ横浜 2005 12/13-15
- 7) 山中仁木, 石橋大輔, 辻 孝雄, 坂口末廣, 片峰 茂 : 大腸菌易熱性下痢毒素サブユニット B 融合プリオンタンパク (PrP) の抗 PrP IgG および IgA 誘導能の検討. 第29回長崎感染症研究会 長崎 2005 3
- 8) 山中仁木, 石橋大輔, 坂口末廣 : 大腸菌易

熱性下痢毒素サブユニット B 融合プリオンタンパク (PrP) の抗 PrP 抗体誘導能の検討. 第 1 回長崎県動物由来感染症検査・研究者協議会 長崎 2005 6/21

- 9) 吉川大介, 坂口末廣, 片峰 茂: siRNA による PrP^{Sc} 抑制効果の検討. 第 42 回日本ウイルス学会九州支部総会 沖縄 2005 7/8-9
- 10) 吉川大介, 坂口末廣, 山口尚宏, 片峰 茂: siRNA による異常型プリオン蛋白抑制効果. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会 パシフィコ横浜 2005 11/20-22
- 11) 山中仁木, 石橋大輔, 坂口末廣, 片峰

茂: 大腸菌易熱性下痢毒素サブユニット B 融合プリオン蛋白の粘膜ワクチンとしての可能性の検討. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会 パシフィコ横浜 2005 11/20-22

- 12) 坂口末廣, 吉川大介, 山口尚宏, 重松和人, 片峰 茂: プリオン蛋白の構造-機能研究と神経保護機能. 第 28 回日本分子生物学会年会 福岡 2005 12/7-10

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

ヒトプリオンの伝達性に関する研究
—自然発症プリオン病モデルマウスの作製—

分担研究者：毛利 資郎 九州大学大学院医学研究院
動物衛生研究所 プリオン病研究センター
分担研究者：三好 一郎 名古屋市立大学大学院医学研究科実験動物研究教育センター
分担研究者：村本 環 東北大学大学院医学研究科創生応用医学研究センター
研究協力者：北本 哲之 東北大学大学院医学研究科創生応用医学研究センター

研究要旨

われわれは、プリオン病の伝達試験による感染性解析のために数多くの遺伝子改変モデル動物を作製している。この中で、自然発症のヒト家族性プリオン病であるゲルストマン・ストロイスラー症候群のモデルとしてマウスプリオン蛋白質遺伝子のコドン 101 をプロリンからロイシンに置換したトランスジェニックマウスを作製し、観察した。500 日を過ぎて、立毛、振せん、歩行不良を呈し、動きが鈍くなったために、安楽死の後、病理組織切片を作製、免疫染色を行った。その結果、空胞変性に加えてシナプス型とプラーク型の混在した異常プリオン蛋白質の沈着が認められた。これらの病理学的変化は GSS 患者と類似していた。感染性については今後の継代実験を必要とするが、自然発症の家族性プリオン病のモデルとして、プリオン病の予防・治療試験のツールに、あるいはプリオン蛋白質構造変換モデルとして期待できる。

A. 研究目的

われわれは、ヒトプリオン病モデルマウスによる伝達試験によりヒトプリオン病の感染性について解明することを目的に研究を行っている。これまで数多くのヒトプリオン病モデル動物を作製し、ヒトプリオンの感染性について明らかにしてきたが、遺伝的(家族性)プリオン病のモデルによる感染性あるいは自然発症モデルの作製に至っていなかった。そこで、家族性プリオン病のモデルとして Gerstmann-Straussler-Scheiker(GSS)と相同の遺伝子変異を有するマウス GSS モデルを作製し、自然発症の有無について調べることを目的とした。

B. 研究方法

ヒト GSS のプリオン蛋白質遺伝子変異である codon 102 のアミノ酸 に相同であるマウスプリオン蛋白質遺伝子の codon101 を Proline から Leucine に置換した GSS トランスジェニックマウス(Tg-MoP101L)を作製する。まず、導入遺伝子 construct を作製するために I/Ln マウス genom より、Promoter、Exson1、Intron1、Exson2、Intron2 を含む 12Kbp の BamHI DNA fragment を、129Sv マウス genome 由来の promoter 上流の BamHI サイトの下流の 6kbp の Exson3 を含む BamHI-SalI fragment の間に挿入されるようにクローニングし、導入遺伝

子の基本構造とした。これは、すでにわれわれが作製している遺伝子改変モデルマウスと同じ構造である¹⁾。次に、129Sv マウス由来の Exson3 の ORF の codon 101 を Proline から Leucine に置換したものを GSS 型マウスプリオン蛋白遺伝子として導入した。これらの Tg マウスのうち発現量の多いラインを対象に発症を観察した。発症と判断されたり、老化により一般状態が悪くなった個体は、右半脳を 10% 緩衝ホルマリン液で固定、蟻酸処理を行い、薄切後、HE 染色、免疫組織染色による診断を行った²⁾。左半脳はその後の継代接種実験、プリオン解析のために凍結保存を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては、九州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。

C. 研究結果

遺伝子改変マウスのうち、導入遺伝子の発現量の多い 3 ラインについて、観察を行った。導入遺伝子コピーが最も多いライン、Tg-MoP101L#52 では 3 頭のうち 1 頭は 391 日で突然死したが、

臨床的にはマウスプリオン病とは判定できなかった。しかし、残り 2 頭のうちの 1 頭が 500 日頃から振せん、後肢麻痺、立毛、尾硬直、ミオクロヌスを発現し、痩せ、無動と進行した。この個体はマウスプリオン病の発症と判断し、生後 520 日で安楽死の処置をとった。残りの 1 頭も 550 日頃から同様の症状を呈したので、568 日で安楽死させた。なお、その他の 2 ラインではそれぞれ 6 頭、4 頭を 637 日から 888 日まで観察し、老化もしくは腫瘍、脱肛などを認めたが、臨床的にマウスプリオン病と診断できる個体は確認できなかった。

病理組織学的検査により Tg-Mo(P101L)#52 の 1 頭は免疫染色で海馬、脳梁、視床、小脳皮質に異常プリオン蛋白の plaque 型沈着が認められた(Fig.1, 2)。視床には non-plaque 型の異常プリオン蛋白の沈着も認められた(Fig.1 C)。しかしながら、海綿状変化は内包に認められたのみで、他の大脳領域では非常に弱いかほとんど認めなかった。残りの 1 頭も小脳皮質に少数の plaque 型異常プリオン蛋白の沈着を認めた。

D. 考察

GSS のモデルマウス Tg-MoP101L において

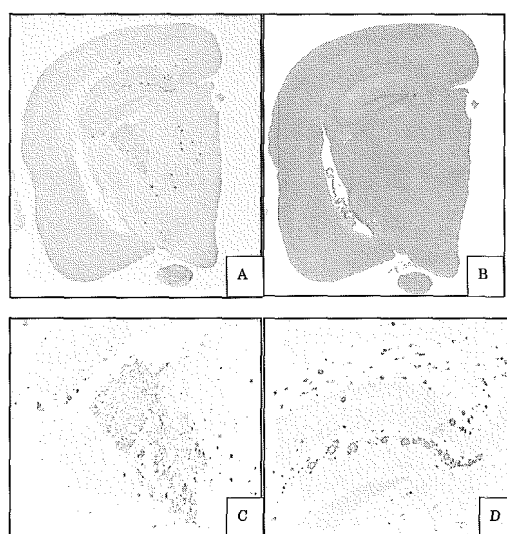


Fig.1 Tg-Mo (P101L) #52 520 days of age

Cerebrum

A : Cerebrum PrP X2

B : Cerebrum HE X2

C : Thalamus PrP X10

D : Hippocampus PrP X10

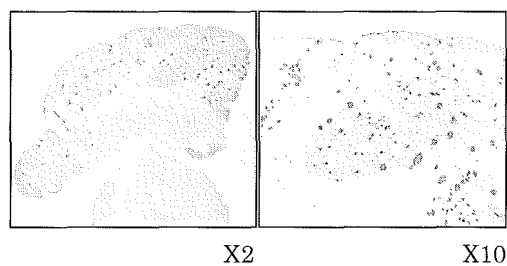


Fig.2 Tg-Mo(P101L)#52 520 days of age
Cerebellum

導入遺伝子発現の最も多いラインで症状を呈した個体は、病理組織学的にヒト GSS の所見に非常によく似ていることが判明した³⁾。すなわち、plaque 型と non-plaque 型の異常プリオン蛋白の沈着が混在すること。小脳皮質に plaque 型沈着が多発することはヒトの GSS と類似していた。このことにより GSS の病変は codon102 の遺伝子変異が病気の成因であることが証明された。これまでに、PrP^Cのみから感染性プリオンの生成が in vivo、in vitro 共に試みられているが、感染性が限局されているか、生成に seed が必要であった^{4,5)}。われわれの自然発症マウスの今後の解析が重要である。

(参考文献)

- 1) Kitamoto T, Mohri S, Ironside J W, 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. *BBRC*. Vol. **294**, No. 2 : 280-286, 2002.
- 2) Kitamoto T, Shin R-W, Doh-ura K, Tomokane N, Miyazono M, Muramoto T, Tateishi J : Abnormal isoform of prion protein accumulates in the synaptic structures of the central nervous system in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Am J Pathol*. **140** : 1285-1294, 1992
- 3) Kitamoto T, Yamaguchi K, Doh-ura K, et al. : A prion protein missense variant is

integrated in plaque cores in patients with Gerstmann-Straussler-syndrome. *Neurology*. **41** : 306-610, 1991

- 4) Hsiao K K, Groth D, Scott M, Yang S-L, Serban H, Rapp D, Foster D, DeArmond S J, Prusiner S B : Serial transmission in rodents of neurodegeneration from transgenic mice expressing mutant prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. **91** : 9126-9130, 1994
- 5) Legname G, Ilia V, Baskakov I V, Nguyen H-O B, Riesner D, Fred E, Cohen F E, DeArmond S J, Prusiner S B : Synthetic Mammalian Prions. *Science*. **305**:673-676, 2004

E. 結論

1. 遺伝的プリオン病のモデルとして GSS の変異遺伝子導入モデルマウスを作製した。
2. およそ 500 日を過ぎて自然発症し、病理組織学的所見で GSS 類似の異常プリオン蛋白の沈着と軽い海綿状変性を認めた。

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Shibata A, Tokunaga T, Asai D, Koizumi O, Mohri S, Nakai M, Yakabe Y, Nose T, Shimohigashi Y : Ligand-inducing conformation changes in the estrogen receptor C-terminal tail moiety and their sensing by polyclonal antibodies. *Peptide*