

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

発現細胞における間接蛍光抗体法の結果、各 PrP の蛍光分布は主に細胞膜に認められ、蛍光顕微鏡観察では特筆すべき差は認められなかった。通常培養 (図 1A-D) および血清除去後 24 時間 (図 1E-H) の顕微鏡観察の結果、血清除去後 24 時間の PrP 欠損細胞 (図 1E)、ハムスター PrP (図 1G) およびウシ PrP 発現細胞 (図 1H) は凝集、円形化し、培養ディッシュから剥離した細胞が多数観察された。さらに、ハムスター PrP およびウシ PrP 発現細胞では PrP 欠損細胞と比較して変性細胞が多数観察された。一方、マウス PrP 発現細胞は通常培養時の付着細胞の形態をよく保持していた (図 1F)。

血清除去後 0、12、24 時間の各細胞から DNA を抽出し、アーガロース電気泳動を行なった (図 2)。PrP 欠損細胞と比較してマウス PrP 発現細胞は従来の報告どおり細胞死抑制を示唆する結果を得た。しかし、ハムスター PrP およびウシ PrP 発現細胞ではむしろ PrP 欠損細胞と比較して断片化 DNA 量がやや多く、細胞死が促進されていることを示唆する結果を得た。これらの結果は断片化 DNA を検出する ELISA によっても確認された (結果非表示)。

血清無添加培地でそれぞれの細胞を培養後、0、12、24、48 時間の細胞変性効果をトリパンブルー色素排除能で比較した結果 (図 3)、マウス PrP 発現細胞と比較して、PrP 非発現細胞、ハムスター PrP 発現細胞およびウシ PrP 発現細胞における色素染色細胞が多数観察された。さらに、血清除去後 48 時間のハムスター PrP 発現細胞およびウシ PrP 発現細胞では、PrP 非発現細胞と比較して、さらに多くの細胞が染色されていた。これらの結果は、Tetra Color ONE 細胞増殖アッセイによっても確かめられた (結果非表示)。以上の結

果から、PrP 欠損細胞と比較してマウス PrP 発現細胞は従来の報告どおり細胞死抑制を示す結果を得たが、ハムスター PrP やウシ PrP 発現細胞ではむしろ PrP 非発現細胞と比較して細胞死が促進されていることを示唆する結果を得た。

これからの結果 (図 1-3) からマウス由来細胞に異種動物由来であるハムスターやウシ PrP を発現させてもアポトーシス抑制効果は認められず、むしろ細胞死が促進されている結果を得た。

通常培養時の細胞株から抽出した蛋白をウエスタンブロット法で解析した結果 (図 4)、マウス、ハムスターおよびウシ PrP は 23-33kDa 付近にいくつかのバンドとして観察され、発現量はほぼ同程度と考えられた。しかし、ハムスター PrP およびウシ PrP は主に 3 本のバンドとして PrP の発現が観察されたが、マウス PrP はそれらバンド以外に約 25kDa のバンドが観察された (図 4△)。

### D. 考察

これまでに一部アミノ酸配列欠損 PrP を用いた研究により、PrP の N 末端領域のアミノ酸配列 53-94 や 95-132 の欠損によってアポトーシス抑制がなくなるが、124-146 の欠損によってはアポトーシス抑制が認められることから PrP アミノ酸配列 1-124 (PrP1-124) が、血清除去後に誘導されるアポトーシス抑制に重要であると報告してきた (1)。また、この PrP1-124 を PrP 様蛋白である Dpl に融合させると、Dpl 自体にはアポトーシス抑制は認められないが、PrP1-124-Dpl 融合蛋白を発現させるとアポトーシス抑制が認められることから、PrP1-124 にアポトーシス抑制活性の部位が存在すると報告した (2)。

マウス PrP は 111/112 番目のアミノ酸部分 (NLKHV↓AGAAA) で切断を受けるという報告がある (3)。マウス PrP で認められた約 25kDa のバンドが切断産物の C 末端部分と考えられた。この領域のアミノ酸配列はハムスター PrP (NMKHM↓AGAAA) やウシ PrP (NMKHV↓AGAAA) では異なっており、マウス由来細胞である PrP 欠損細胞にハムスター PrP やウシ PrP を

発現させた場合にはうまく切断されないと考えられた。PrP は切断された N 末端産物である PrP1-111 がアポトーシス抑制に働き、切断されない産物の代謝不具合によってアポトーシス促進に働いていると推測された。

#### E. 結論

PrP 再発現化に伴うアポトーシス抑制には PrP が NLKHV↓AGAAA での切断を受け、N 末端領域 PrP1-111 がアポトーシス抑制に働いていると考えられる。

#### [参考文献]

1. 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* 2005;326(3):600-606.
2. Lee DC, Sakudo A, Kim CK, Nishimura T, Saeki K, Matsumoto Y, Yokoyama T, Chen SG, Itohara S and Onodera T. Fusion of Doppel to octapeptide repeat and N-terminal half of hydrophobic region of prion protein confers resistance to serum deprivation. *Microbiol Immunol* 2006; 50(3):203-9.
3. Mange A, Beranger F, Peoc'h K, Onodera T, Frobert Y, Lehmann S: Alpha- and beta-cleavages of the amino-terminus of the cellular prion protein. *Biol Cell* 2004; 96(2):125-132.

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

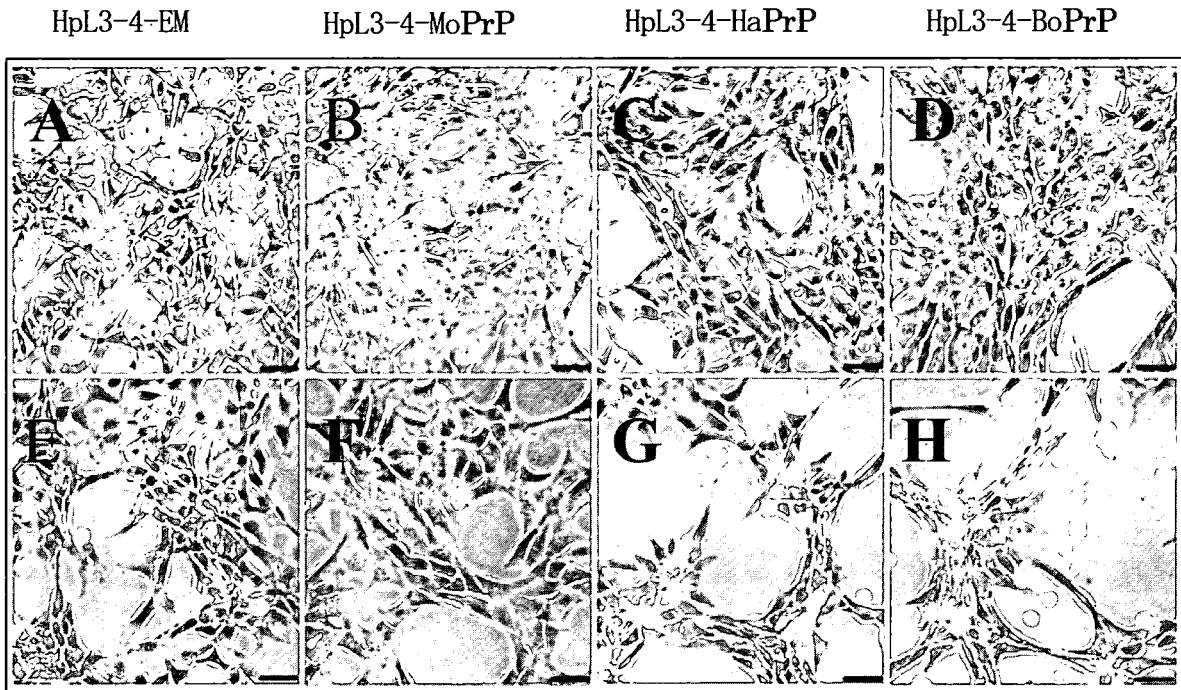
##### 1. 論文発表

1. Nakamura I, Xue G, Sakudo A, Saeki K, Matsumoto Y, Ikuta K, Onodera T. Novel Single Nucleotide Polymorphisms in the Specific Protein 1 Binding Site of the Bovine PRNP Promoter in Japanese Black Cattle: Impairment of Its Promoter Activity. *Intervirolog* 2007;50(3): 190-196.
2. Sakudo A, Nakamura I, Lee DC, Saeki K, Ikuta K, Onodera T. Neurotoxic prion protein (PrP) fragment 106-126 requires the N-terminal half of the hydrophobic region of PrP in the PrP-deficient neuronal cell line: *Protein Pept Let* 2007;14(1):1-6.
3. Onodera T, Sakudo A, Wu G, Saeki K. Bovine spongiform encephalopathy in Japan: history and recent studies on oxidative stress in prion diseases. *Microbiol Immunol* 2006;50(8):565-578.
4. Sakudo A, Onodera T, Suganuma Y, Kobayashi T, Saeki K, Ikuta K. Recent advances in clarifying prion protein functions using knockout mice and derived cell lines. *Mini Rev Med Chem* 2006; 6(5):589-601.
5. Lee DC, Sakudo A, Kim CK, Nishimura T, Saeki K, Matsumoto Y, Yokoyama T, Chen SG, Itohara S Onodera T. Fusion of Doppel to octapeptide repeat and N-terminal half of hydrophobic region of prion protein confers resistance to serum deprivation. *Microbiol Immunol* 2006;50(3):203-209.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

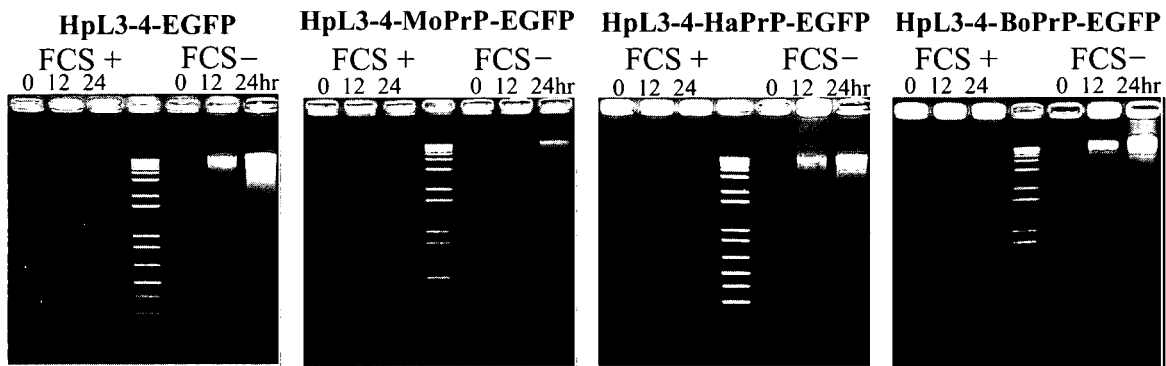
なし

図1. 通常培養および無血清培養後 24 時間の細胞の形態



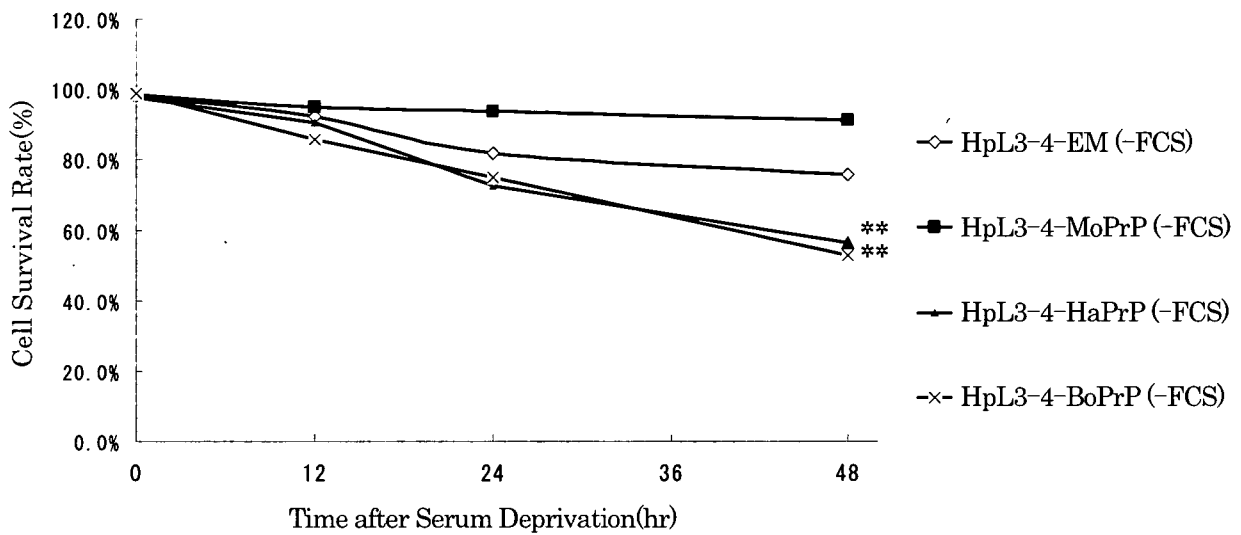
PrP 非発現細胞 (HpL3-4-EM)、マウス PrP 発現細胞 (HpL3-4-MoPrP)、ハムスター PrP 発現細胞 (HpL3-4-HaPrP)、ウシ PrP 発現細胞 (HpL3-4-BoPrP)。血清添加培地による培養後 24 時間 (A-D)。無血清培地培養後 24 時間 (E-H)。

図2. アーガロース電気泳動による DNA 断片化解析



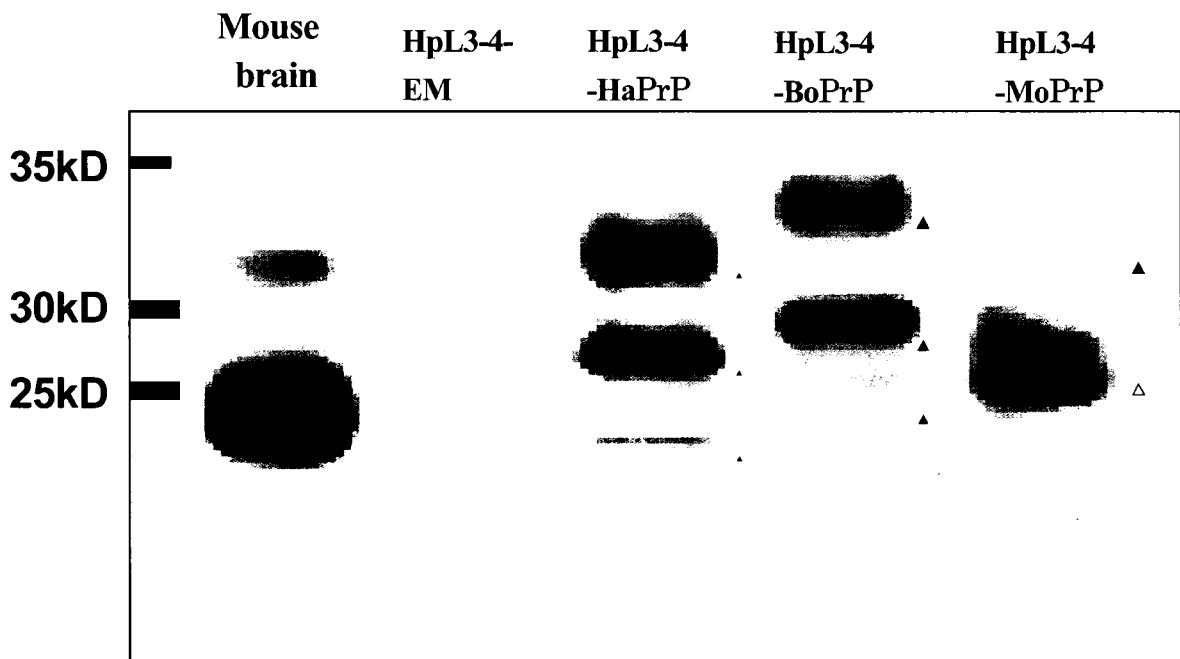
PrP 非発現細胞: HpL3-4-EGFP、マウス PrP 再発現細胞: HpL3-4-MoPrP-EGFP、ハムスター PrP 再発現細胞: HpL3-4-HaPrP-EGFP、ウシ PrP 再発現細胞: HpL3-4-BoPrP-EGFP、FCS+: 血清添加培地 FCS-: 血清無添加培地。血清無添加培地置換後 0、12、24 時間後の細胞より DNA を抽出しアーガロース電気泳動を行なった。

図3. トリパンプルー色素排除試験



血清無添加培地でそれぞれの細胞を培養後、トリパンプルー染色を行なった。血清除去後 48 時間における PrP 非発現細胞の非染色率とそれぞれの細胞の非染色率と比較した。p<0.01 (\*\*)

図4. ウェスタンブロット解析



通常培養時の細胞株から抽出した蛋白を SDS-PAGE を行なった後、メンブレンに転写し、抗 PrP 抗体 (T2) を用いてウェスタンブロット法で解析した。マウス、ハムスターおよびウシ PrP 発現細胞で観察された 23-33kDa 付近の PrP を ▲ および △ で示した。ハムスター PrP およびウシ PrP は主に 3 本のバンドとして PrP の発現が観察されたが、マウス PrP はそれらバンド以外に約 25kDa のバンドが観察された (図4 △)。

## Yeast two-hybrid 法によるプリオン蛋白 N 末領域に結合する分子の同定

研究分担者：坂口 末廣 徳島大学分子酵素学研究センター分子細胞学部門

研究協力者：山口 仁孝 徳島大学分子酵素学研究センター分子細胞学部門

研究協力者：森 剛志 徳島大学分子酵素学研究センター分子細胞学部門

### 研究要旨

正常プリオン蛋白(PrP<sup>C</sup>)の正常機能を解明するために、N 末領域(23-120)に結合する分子を yeast two-hybrid 法を用いて検索した。その結果、36 個の遺伝子を同定した。これらの遺伝子の中には、既に PrP と結合することが知られている分子も同定された。また、複数個のコロニーから、シナプス小胞の輸送、蛋白分解、及び電気シグナルに関与する遺伝子が同定された。

### A. 研究目的

我々は、レコンビナントプリオン蛋白(PrP)にアルカリ・フォスファターゼを標式した融合蛋白を PrP 欠損神経細胞株と反応させた結果、この融合蛋白と特異的に結合する分子が PrP 欠損神経細胞株に存在し、しかも N 末領域(23-120)を介して結合している可能性を報告した<sup>1)</sup>。正常プリオン蛋白(PrP<sup>C</sup>)はそのホモログ蛋白である PrPLP/Dpl の神経変性作用と機能的に拮抗し、小脳プルキンエ細胞の変性死を抑制する<sup>2)</sup>。さらにその拮抗に重要な領域は、PrP<sup>C</sup>の N 末領域(アミノ酸 23-88)に存在する<sup>3)</sup>。つまりこれらの結果は、PrP<sup>C</sup>が N 末領域を介して宿主分子と結合し、PrPLP/Dpl の機能を阻害するシグナルを産生している可能性を示した。そこで我々は、PrP<sup>C</sup>の正常機能をさらに解明するために、yeast two-hybrid 法を用いて、N 末領域(23-120)に結合する分子の同定を試みた。

### B. 研究方法

#### 1. Yeast Two-Hybrid 法 (図 1)

polymerase chain reaction (PCR)にて増幅したマウス PrP23-120 を、pGBKT7 (TaKaRa-Clontech, Tokyo, Japan) に挿入し、pGBKT7-PrP23-120 を作製した。

pGBKT7-PrP23-120 を酵母 AH109 株へ導入した後、マウス脳 cDNA ライブラリーを導入した酵母 Y187 (5×10<sup>7</sup> colony forming units, TaKaRa-Clontech) と振とう培養し有性生殖を行わせた。交配した酵母は、Trp、Leu、His を欠いたアミノ酸要求性寒天培地 SD(-Trp/-Leu/-His)に塗布し、一次スクリーニングを行った。生育した酵母コロニーは、さらに選択性の高いアミノ酸要求性寒天培地 SD(-Ade/-Trp/-Leu/-His/+X-α gel)を用いて二次スクリーニングを行った。

#### 2. インサート遺伝子の同定

二次スクリーニングで得られた酵母から抽出したプラスミドを、キャピラリーシクエンサー ABI PRISM®3100 Genetic Analyzer (Applied BioSystems)に供し、インサート遺伝子の塩基配列を決定した。その後、ホモロジー検索を行い、インサート遺伝子の同定を行った。

### C. 研究結果及び D. 考察

我々は、PrP<sup>C</sup>の正常機能を解明するために、N 末領域 (23-120) に結合する分子を yeast two-hybrid 法を用いて同定した。1 次スクリーニングの結果、128 個の陽性コロニーを得た(表 1)。これらを 2 次スクリーニングに供した結果、75

個の陽性コロニーを得た(表1)。この陽性コロニーからプラスミドを抽出しインサート遺伝子の塩基配列を決定した結果、36個がin-frameで遺伝子が挿入されていた(表1)。しかし、残りの39個では、インサート遺伝子がout-of-frameで挿入されていた。おそらくこれらの酵母ではレポーター遺伝子のリーキーな発現が誘導され、2次スクリーニングでも成育してきたと考えられた。

同定された遺伝子の中には、複数個のコロニーから同定されたものや、1個のコロニーから同定されたものまであった。またこれらの遺伝子の中には、既にPrPと結合することが知られている分子(Dnaja3 protein)も同定された<sup>4</sup>。さらに、シナプス小胞の輸送、蛋白分解、及び電気シグナルに関与する遺伝子が複数個同定された。PrP<sup>C</sup>の正常機能を解明することは、プリオン病の分子病態解明のためにも重要である。今後は、同定した遺伝子がPrP<sup>C</sup>の正常機能にどのように関与するのか検討する。

## E. 結論

PrP<sup>C</sup>の正常機能を解明するために、N末領域(23-120)に結合する分子をyeast two-hybrid法を用いて検索した結果、36個の遺伝子を同定した。

### [参考文献]

1. 坂口末廣、尹載宇. プリオン蛋白はN末領域で宿主蛋白と結合する. プリオン病及び遅発性ウイルス感染に関する調査研究. 平成16年度総括・分担研究報告書 2005;157-162.
2. Yamaguchi N, Sakaguchi S, Shigematsu K, Okimura N, Katamine S. Doppel-induced Purkinje cell death is stoichiometrically abrogated by prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;319:1247-1252.
3. Atarashi R, Nishida N, Shigematsu K, Goto S, Kondo T, Sakaguchi S, Katamine S. Deletion of N-terminal residues 23-88 from prion protein (PrP) abrogates the potential

to rescue PrP-deficient mice from PrP-like protein/Doppel-induced neurodegeneration. *J Biol Chem* 2003;278: 28944-28949.

4. Beck KE, Kay, JG, Braun JEA. Rdj2, a J protein family member, interacts with cellular prion PrP<sup>C</sup>. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;346:866-871.

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Sakaguchi S, Arakawa T. Recent developments in mucosal vaccines against prion diseases. *Expert Rev Vaccines* (in press).
2. Ishibashi D, Yamanaka H, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Nakamura R, Okimura N, Yamaguchi Y, Shigematsu K, Katamine S, Sakaguchi S. Immunization with recombinant bovine but not mouse prion protein delays the onset of disease in mice inoculated with a mouse-adapted prion. *Vaccine* 2007;25:985-992.
3. Yoshikawa D, Kopacek J, Yamaguchi N, Ishibashi D, Yamanaka H, Yamaguchi Y, Katamine S, Sakaguchi S. Newly established *in vitro* system with fluorescent proteins shows that abnormal expression of downstream prion protein-like protein in mice is probably due to functional disconnection between splicing and 3' formation of prion protein pre-mRNA. *Gene* 2007;386: 139-146.
4. Sakaguchi S. Roles of Prion Protein and Prion Protein-Like Protein in Neurodegeneration: Implication in the Pathogenesis of Prion Diseases. In: Bridgette V. Douphet ed. *PRIONS*: New

Research . Nova Science Publishers, Inc  
2006:53-71.

5. Kawatake S, Nishimura Y, Sakaguchi S, Iwaki T, Doh-ura K. Surface plasmon resonance analysis for the screening of ant-prion compounds. *Biol Pharm Bull* 2006;29(5):927-932.
6. 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* 2006;24:2815-2823.

## 2. 学会発表

1. Sakaguchi S. Antagonistic interaction

between prion protein and its homologue, PrPLP/Dpl, in neurodegeneration. AACL-Nagasaki Symposium, ASIAN AGING 2006: The Regional Aging Connection and the Future, June 17, 2006.

2. 石橋大輔、山中仁木、片峰茂、坂口末廣：異種プリオン蛋白免疫によるプリオン病の予防（ポスター）．生体機能と創薬シンポジウム 2006 福岡「疾病の標的分子と治療薬開発の最前線」，福岡，2006.9.8-9.

## H. 知的財産の出願・登録状況

なし

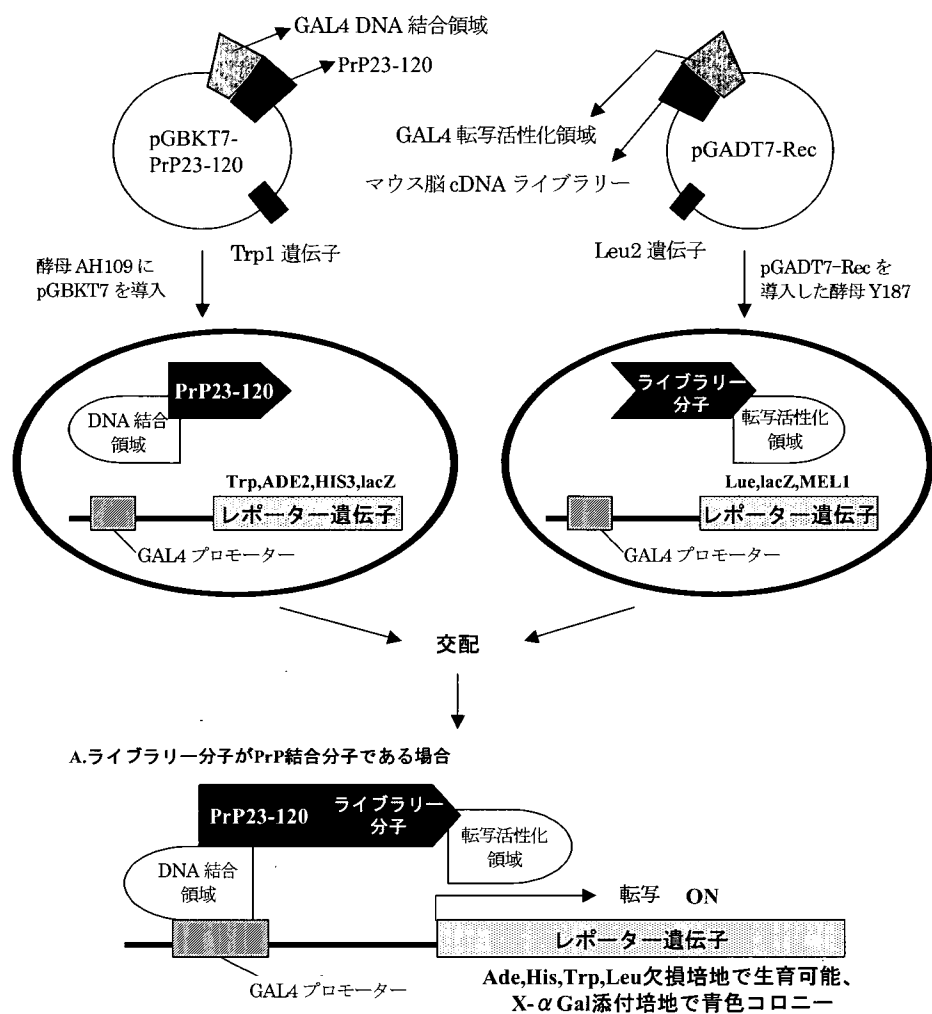


図 1 : Yeast two-hybrid法によるPrPのN末領域に結合する分子の同定の手順

表 1 : 各スクリーニング後のコロニー数

	コロニー数
一次スクリーニング	128
二次スクリーニング	75 ( in-frame : 36 )



## 遺伝子改変モデルマウスによるプリオン伝達試験（５） （ノックインマウスによるプリオン伝達性の比較解析）

分担研究者：毛利 資郎 動物衛生研究所プリオン病研究センター

研究協力者：北本 哲之 東北大学大学院医学系研究科創生応用医学研究センター

研究協力者：伊藤 守 実験動物中央研究所

### 研究要旨

ヒト型プリオン蛋白質遺伝子ノックインマウスのうちコドン129メチオニンホモ（Ki-Hu129MM）、コドン129バリンホモ（Ki-Hu129VV）とウシ型プリオン蛋白質遺伝子ノックインマウス（Ki-Bo）を用いて孤発性 CJD（sCJD）変異型 CJD（vCJD）、BSE プリオンを用いてそれぞれのマウスに対する脳内接種による伝達性について比較解析した。その結果、sCJD の MM 型は Ki-Hu129MM マウスに VV 型は Hu-129VV マウスに効率よく伝達されたが、Ki-Bo マウスには伝達できなかった。それに対して vCJD は Ki-Bo マウスにも良く伝達できた。しかしながら、BSE はウシ型マウスのみには伝達できなかった。ウシ型マウスに伝達できた vCJD と BSE は病理像と WB の結果が類似していた。

### A. 研究目的

種々のプリオン蛋白質遺伝子改変マウス（ノックインマウス）を用いて、プリオンの感染性（伝達性）とプリオン株の生物学的性状を明らかにし、全てのプリオンに適応できるバイオアクセス系を構築すること、プリオン伝達の要因を明らかにすることを目的とする

本年度は、ヒト型プリオン蛋白質遺伝子ノックインマウス2系統とウシ型プリオン蛋白質遺伝子ノックインマウス1系統を用いて孤発性 CJD（sCJD）変異型 CJD（vCJD）、BSE プリオンの各マウスへの伝達性を脳内接種により比較した。

### B. 研究方法

1) 同じカセットを用いた相同組換えにより作製した遺伝子改変マウス、いわゆるノックインマウスを用いて孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病（sCJD）2種類（MM1型、VV2型）、英

国の変異型 CJD（vCJD）2例、BSE 3例の伝達試験を行った。

2) ノックインマウスはヒト・プリオン蛋白質遺伝子コドン129メチオニン型（Ki-Hu129M）、コドン129バリン型（Ki-Hu129V）、ウシ・プリオン蛋白質遺伝子（Ki-Bo）を導入され、交配によってそれぞれの遺伝子をホモ化されたものである。

3) プリオンは PBS にて10%脳乳剤を作製し、上清を60℃、30分間加熱処理した後、マウスの脳内に20μl接種した。

4) マウスはプリオン病を発症もしくは発症と考えられなくても一般状態が悪くなった場合に安楽死させ、半脳をホルマリン標本に、半脳を凍結し、プリオンが伝達されたかどうかについて、免疫組織化学（IHC）およびウェスタンブロットティング（WB）で調べた。

#### (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及び農林水産試験研究独立行政法人における動物実験等の実施に関する基本指針に従い、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

1) sCJD の MM1 型は Ki-Hu129MM マウスに平均 460 日で全頭伝達できたが、Hu-129VV マウスに対しては潜伏期間も延長し、全頭発症しなかった。反対に VV2 型は Hu-129VV マウスに潜伏期間 311 日で効率よく伝達されたが、ノックインより感受性が高いと考えられる Ki&Tg-Hu129MM マウスでも潜伏期間が 651 日と大幅に延長した。ヒト sCJD の MM1 型は Ki-Bo マウスには伝達できなかつた。VV2 型は現在観察中である。一方、vCJD はヒト型マウスへの伝達効率は 100%ではなかつたが、Ki-Bo マウスには 100%伝達できた。BSE はウシ型マウスのみには伝達できなかつた (表 1)。

2) WB の結果、sCJD の MM1、VV2 を伝達されたノックインマウス脳の MM1 はタイプ 1、VV2 はタイプ 2、とそれぞれ由来の CJD と同じ糖鎖パターンを示した。vCJD と BSE を伝達されたウシ型マウス (Ki-Bo) の脳は同じ糖鎖パターンではあつたが、非糖鎖バンドの分子量はタイプ 1 とタイプ 2 の中間を示した (図 1)。vCJD と BSE を伝達されたノックインマウスの脳および脊髄の病理像は類似していた。

#### D. 考察

我々の作製した遺伝子改変マウスでは、同じ導入遺伝子ベクターを用いており、ノックインマウスではマウスの野生型プリオン蛋白質遺伝子が導入プリオン蛋白質遺伝子と相同組換えされているために、それぞれのマウスのプリオン感受性について比較が可能である。sCJD の

MM 型、VV 型ヒトプリオンについては、MM 型は Ki-Hu129MM マウスへ VV 型は Ki-Hu129VV マウスへ易伝達性であることからアミノ酸の一次構造が伝達に大きく関与していることが示された。vCJD はコドン 129 は MM 型であるが、Hu129MM 型マウスや Hu129VV 型マウスよりウシ型マウス Ki-Bo に効率よく伝達された。ヒトプリオンはヒト型に易伝達性であり、ウシには難伝達性であることを考えると、vCJD の由来がウシであるためにウシに伝達し易いと考えられる。加えて、伝達された Ki-Bo マウス脳の WB の糖鎖パターンと非糖鎖バンドの分子量が vCJD と BSE では同じであつた (図 1)。また、免疫組織学による異常プリオン蛋白質沈着のパターンも非常に類似していたことを合わせて考えると vCJD と BSE は同じプリオンである。異種動物に伝達後も由来プリオンの性状が残存する現象は非常に興味深い。

#### E. 結論

プリオンの伝達性に関して

1. アミノ酸の 1 次構造 (ヒト型: 129M、129V、ウシ型) が主要因である。
2. 1 次構造のみならず由来動物種に対する易伝達性が認められた。
3. vCJD と BSE はウシ型プリオン蛋白質発現マウスに同等の伝達性と類似の病理変化を示した。

#### [参考文献]

1. Asano M, et al.: vCJD prion acquires altered virulence through trans-species infection. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;vol.342(1):293-9.
2. Jonathan D.F, Wadsworth J.D.F, et al. Human Prion Protein with Valine 129 Prevents Expression of Variant CJD Phenotype. *Science* 2004;306-5702:1793-1796.

3. Kitamoto T, et al. Follicular dendritic cell of the knock-in mouse provides a new bioassay for human prions. *Biochem and Biophys Res Commun* 2002;294:280-286.
4. Andrew F. Hill, et al.: The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 1997;389: 448-450.
- Tamaoki N, Kitamoto T. vCJD prion acquires altered virulence through trans-species infection. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;342(1):293-239.
2. 学会発表
1. 毛利資郎: 伝達性海綿状脳症の遺伝的要因. 日本遺伝学会第78回大会. つくば市. 2006.9.25

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Asano M, Mohri S, Ironside JW, Ito M,

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
3. その他 なし

表1. 遺伝子改変マウスに対する伝達性と潜伏期間

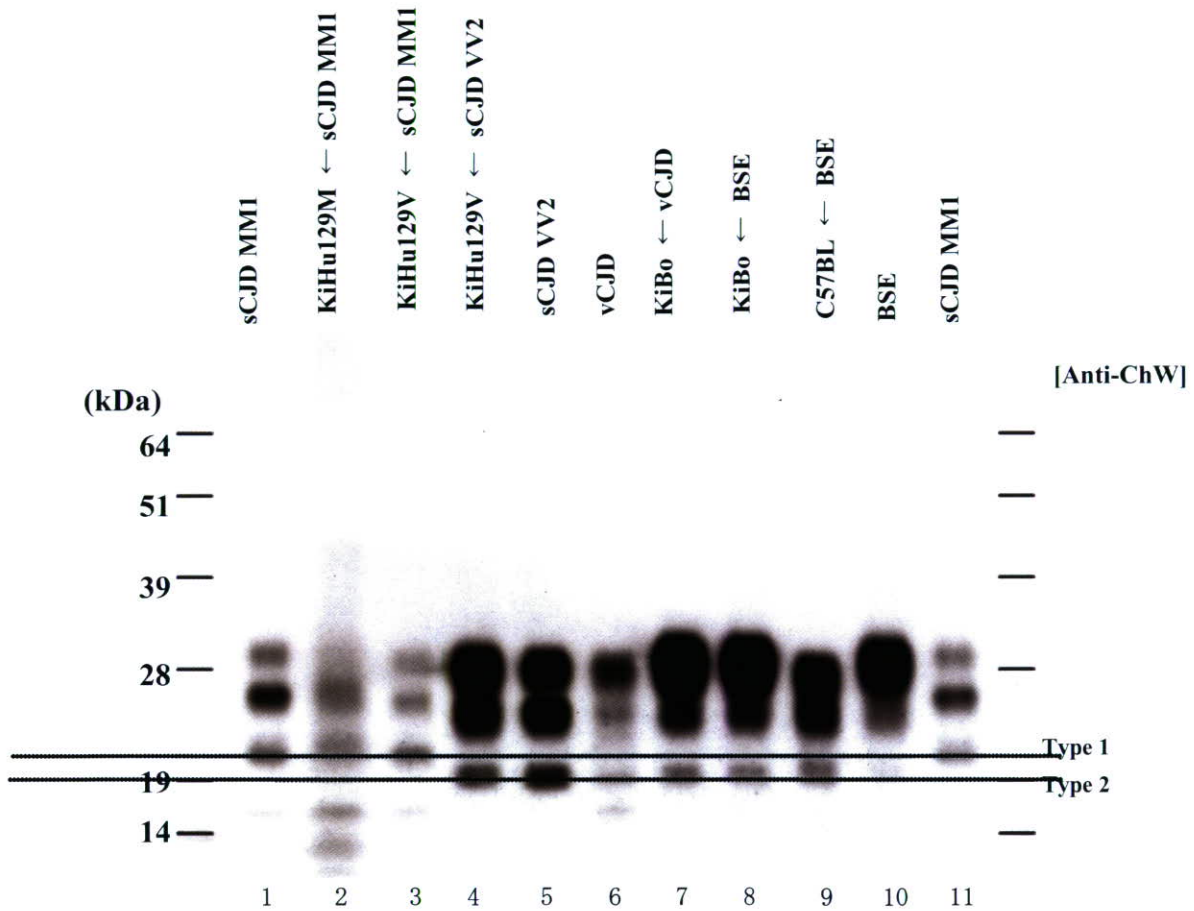
Prion	Mouse		
	Ki-Hu129MM	Ki-Hu129VV	Ki-Bo
<b>sCJD</b>			
H-3 (MM1)	9/9* (460)	2/3 (595)	0/5
Ak (VV2)	5/5 (Ki&Tg) (651)	4/4 (311)	nt
<b>vCJD</b>			
96/02	nt	0/4	4/4 (492)
96/07	4/4 (M/W)** (703)	3/4 (Ki&Tg) (602)	4/4 (617)
<b>BSE</b>			
BSE1	0/6	0/4	4/4 (693)
BSE2	0/5	0/4	6/6 (658)
BSE3	0/4	0/4	5/5 (607)

\* PrP positive mice/tested mice.

Parentheses show the average days of incubation period.

\*\* hemizygote with 129M and wild-mouse

図1. 各種プリオンと伝達後の遺伝子改変マウスの WB 解析



Lane1, 11 はヒト sCJD-MM1 型、lane2 はヒト sCJD-MM1 型を伝達されたヒト型プリオン蛋白質遺伝子ノックインマウスでコドン 129 メチオニン型 (KiHu129M)、lane3 はコドン 129 バリン型 (KiHu129V) マウス。

Lane4 はヒト sCJD-VV2 型を伝達された kiHu129V マウス、lane5 はヒト sCJD-VV2 型、lane6 はヒト vCJD で lane7 はヒト vCJD を伝達されたウシ型プリオン蛋白質遺伝子ノックイン (kiBo) マウス。Lane8 は BSE ウシを伝達された KiBo マウス、lane9 は BSE を伝達された野生型マウス (C57BL)、lane10 は BSE ウシ。

## ノックインマウスを用いた変異型クロイツフェルト・ヤコブ病プリオンの感染性の解析

分担研究者：小林 篤史 東北大学大学院医学系研究科 CJD 早期診断・治療法開発分野  
研究協力者：北本 哲之 東北大学大学院医学系研究科 CJD 早期診断・治療法開発分野

### 研究要旨

変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(vCJD)は牛海綿状脳症(BSE)プリオンが感染することによって引き起こされると考えられているが、これらの一次感染患者ではプリオン蛋白遺伝子コドン 129 の多型はメチオニンのホモ接合(129M/M)である。vCJD 患者からの二次感染においてもコドン 129 のメチオニン(M)/バリン(V)の多型が感受性と関連するのかを明らかにするためコドン 129M/M, M/V, V/V のヒトプリオン蛋白を発現するヒト型ノックインマウスを作製し、脾臓の濾胞樹状細胞(FDC)を用いたアッセイにより vCJD プリオンに対する感受性を比較した。免疫組織化学的検索およびウェスタンブロットの結果、129M/M だけでなく M/V マウスの脾臓でも異常型プリオン蛋白の蓄積が認められた。この結果から vCJD 二次感染においては 129M/M だけでなく M/V のヒトでも感染の危険性があることが示唆された。またウシプリオン蛋白を発現するウシ型ノックインマウスを用いた FDC アッセイでは、検索した全てのヒトプリオン株の中で vCJD プリオンのみがウシプリオン蛋白を異常化できた。種を越えた感染の後でもプリオンには由来となった動物種のプリオン蛋白を異常化しうる能力があることを利用したこのようなトレースバック実験は、今後新たなプリオン病が発生した場合にそのプリオンの由来を探るための有用な手段となると考えられる。

### A. 研究目的

これまで報告されている変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(vCJD)一次感染患者ではプリオン蛋白遺伝子コドン 129 の多型はメチオニンのホモ接合(129M/M)である。vCJD 患者からの輸血や手術器具を介した二次感染の場合における感受性と遺伝子型との関連についてはまだ分かっていない。そこで本研究ではヒト型ノックインマウスを用いた感染実験を行って、コドン 129 の多型と vCJD プリオン感受性との関連を明らかにする。またウシ型ノックインマウスを用いた感染実験を行って、vCJD プリオンはウシプリオン蛋白を異常化する能力を保持していることを確認する。

### B. 研究方法

コドン 129M/M, M/V, V/V のヒトプリオン蛋白を発現するヒト型ノックインマウス(Ki-Hu129M/M, M/V, V/V)およびウシプリオン蛋白を発現するウシ型ノックインマウス(Ki-Bov/Bov)を作製した。BSE 感染牛脳ホモジネートあるいは vCJD, 孤発性 CJD(sCJD), 硬膜移植関連 CJD(dCJD)患者脳ホモジネートをこれらのノックインマウスの腹腔内に接種した。接種 75 日後にマウスを解剖して脾臓を採取し、免疫組織化学的検索およびウェスタンブロットにより異常型プリオン蛋白を検出した。

### (倫理面への配慮)

ヒトを対象とした研究に際しては東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会の規定に従い研究を行

った。また動物実験に関しては九州大学動物実験に関する指針を遵守した。

### C. 研究結果

BSE プリオンを接種したヒト型ノックインマウスのうち異常型プリオン蛋白の蓄積が認められたのは 129M/M マウスだけであった(表 1)。vCJD プリオンを接種したヒト型ノックインマウスでは 129M/M だけでなく 129M/V マウスでも異常型プリオン蛋白の蓄積が認められた(図 1)。

ウシ型ノックインマウスへの感染実験では vCJD プリオンを接種したマウスでのみ異常型プリオン蛋白の蓄積が認められた(表 1)。

### D. 考察

BSE プリオンが 129M/M のヒトプリオン蛋白のみを異常化できたことは、報告されている全ての vCJD 一次感染患者が 129M/M であることと一致する。一方、vCJD プリオンが 129M/V のヒトプリオン蛋白も異常化できたことは、vCJD 患者からの二次感染では 129M/V のヒトでも感染の危険性があることを示唆している。また BSE プリオンと比べて 129M/M マウスでの陽性率も高かったことから、vCJD プリオンは BSE プリオンよりもヒトプリオン蛋白を異常化する能力が高くなっていると考えられる。

vCJD プリオンがウシプリオン蛋白を異常化できたことから、種を越えた感染の後でもプリオンは由来となった動物種のプリオン蛋白を異常化する能力を保持していることが示された。ウシプリオン蛋白を異常化できたのは検索した全てのヒトプリオン株の中で vCJD プリオンだけであり、このようなトレー

スバック実験は今後新たなプリオン病が発生した場合にそのプリオンの由来を探るための有用な手段となると考えられる。

### E. 結論

vCJD 二次感染においては 129M/M だけでなく M/V のヒトでも感染の危険性があることが示唆された。また検索した全てのヒトプリオン株の中で vCJD プリオンのみがウシプリオン蛋白を異常化できたことから、トレースバック実験の有用性が確認された。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Asano M, Mohri S, Ironside J W, Ito M, Tamaoki N, Kitamoto T. vCJD prion acquires altered virulence through trans-species infection. *Biochem Biophys Res Commun*2006;342: 293-299.

#### 2. 学会発表

なし

### 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

表1 ノックインマウスの感受性の比較

接種プリオン	マウス	異常型プリオン蛋白の蓄積	
		IHC	WB
BSE	Ki-Hu129M/M	0/21	+*
	Ki-Hu129M/V	0/10	-
	Ki-Hu129V/V	0/29	-
vCJD	Ki-Hu129M/M	7/10	+
	Ki-Hu129M/V	13/17	+*
	Ki-Hu129V/V	0/20	-
vCJD	Ki-Bov/Bov	10/11	+
sCJD (MM1)	Ki-Bov/Bov	0/5	-
(MM2C)	Ki-Bov/Bov	0/5	-
(MM2T)	Ki-Bov/Bov	0/4	-
(MV1)	Ki-Bov/Bov	0/5	-
(MV2)	Ki-Bov/Bov	0/5	-
(VV2)	Ki-Bov/Bov	0/6	-
dCJD (non-plaque type)	Ki-Bov/Bov	0/7	-
(plaque type)	Ki-Bov/Bov	0/11	-

IHC：脾臓の免疫組織化学的検索結果(異常型プリオン蛋白の蓄積を認めた個体数/検索した個体数)  
 WB：脾臓のウェスタンブロットによる検索結果 (\*はシグナルは弱いですが陽性を示すもの)

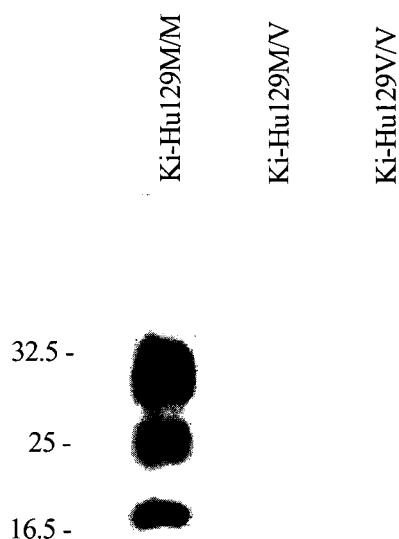


図1 vCJD プリオンを接種したヒト型ノックインマウスにおける異常型プリオン蛋白の蓄積  
 vCJD プリオン腹腔内接種 75 日後に脾臓を採取し、ウェスタンブロットにより異常型プリオン蛋白を検出した。

## プリオン感染および治療に伴って発現が変動する遺伝子の解析

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  
研究協力者：毛利 資郎 動物衛生研究所・プリオン病研究センター  
研究協力者：宮本 智美 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  
研究協力者：村本 環 東北大学大学院医学系研究科 CJD 早期診断・治療法開発分野  
研究協力者：北本 哲之 東北大学大学院医学系研究科 CJD 早期診断・治療法開発分野

### 研究要旨

プリオン病の感染初期には異常感染型プリオンタンパク (PrP<sup>Sc</sup>) の増幅など生体の特異的な反応が予想されることから、関与する分子を捕捉する目的で、マウス接種実験およびプリオン持続感染マウス神経芽細胞腫株 (ScN2a) の治療および再感染の各々の段階で発現の変動を示す遺伝子をマイクロアレイにより検索してきた。今回、これまでに得られた情報をもとに、発現の変動が期待される 37 候補遺伝子を対象に Real time-PCR により定量的解析を行った。殆どの遺伝子は細胞レベルと個体接種で得られた結果の間に密接な関連を示さなかった。その中で、細胞の再感染実験で感染に伴い高発現を示した 6 遺伝子は、siRNA 導入によりその発現が抑制されると ScN2a プリオン高感受性クローンの PrP<sup>Sc</sup> 増殖を促進する傾向を示した。逆に間接的に発現が促進されると PrP<sup>Sc</sup> 増殖が抑制されたことから、これらの遺伝子（産物）が異常タンパク反応、あるいはシヤペロン活性化、小胞体関連分解など、たんぱく質の品質管理や細胞内輸送に関連する機能を持つことと矛盾しないと考えられた。

### A. 研究目的

開発されつつあるプリオン病治療法に対応し、その発展を促す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<sup>Sc</sup> の伝達・増殖機構の解明が必要とされる。我々はこれまで、プリオン病の感染初期には異常感染型プリオンタンパク (PrP<sup>Sc</sup>) の伝播・増幅など、生体の特異的な反応が予想されることから、関与する分子を転写（産物）レベルで捕捉する目的で、マイクロアレイによりマウス接種実験で発現の変動を示す遺伝子を検索してきた。また、ScN2a 細胞を用いて試験管内感染や治療の実験を行い、PrP<sup>C</sup> 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把握する

目的で遺伝子発現プロファイリングを実施した。今回、これまでに得られた情報をもとに、発現の変動を示す 37 候補遺伝子に関して Real time-PCR により定量的に解析した。さらに、その中で細胞の再感染実験で培養時の細胞密度に関係なく感染に伴い高発現を示した 6 遺伝子について、プリオン高感受性クローン (ScN2a-5) を用いて siRNA 導入による発現抑制が PrP<sup>Sc</sup> 増殖にどのような影響を与えるか検討した。

### B. 研究方法

福岡 1 株あるいは正常脳 10% 乳剤を C57BL/6 マウスの脳 (20 $\mu$ l) および腹腔内 (50 $\mu$ l) に接種し、2 及び 10、30 日後に採取し



た脾臓、脳等から mRNA を抽出した。また、コンゴレッド(CR) 存在下 (2.5 µg/ml) で培養し、ウエスタンブロット法で PrP<sup>Sc</sup> 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 に、PrP<sup>Sc</sup> を産生している ScN2a あるいは対照の N2a の超音波処理乳剤を加えて再感染させた後、細胞濃度を変えて (1:12 および 1:8) 継代した細胞から RNA を抽出・精製した。これらの RNA をテンプレートとし、感染あるいは非感染細胞の間で発現の変動を示す 11 遺伝子、および、Ingenuity Pathway Analysis によってそれらとの相互作用が示唆される遺伝子、個体接種実験で選択された遺伝子などの中から任意に選び出した 37 遺伝子について (図 1)、TaqMan probe 用い Real time-PCR を実施した。

細胞の再感染実験で感染に伴い高発現を示した 6 遺伝子 (図 1 および表 1) は、本研究班分担研究者堀内基広博士より分与されたプリオン高感受性クローン(ScN2a-5)を用い siRNA 導入による PrP<sup>Sc</sup> 増殖への影響について解析した。24-well plate で培養した ScN2a-5 に各々の siRNA (80nM, Dharmacon 社 siGENOME SMART pool)を Lipofectamine および Opti-MEM 混合溶液としてトランスフェクトし、24 時間培養した後、等量の DMEM を加えてさらに 48 時間培養した。各々の well について細胞数測定、あるいは RNA 抽出、可溶化粗タンパク画分の回収を行った。PrP<sup>Sc</sup> 蓄積量は、可溶化粗タンパク画分をプロテアーゼ K 処理した後、堀内基広博士より分与された抗 PrP モノクローナル抗体 mAb31C6 を用いたイムノブロットにより解析した。相対的 PrP<sup>Sc</sup> 量は、イムノブロットで可視化されたスポットを image J でデンシトメトリーして取り込み、細胞数当たりの値として表した。

## C. 研究結果

図 1 に示す様に、試験管内感染前後では、細胞密度にかかわらず非感染・感染の間で 37 遺伝子の発現に相違が認められるが、低密度比感染時の PrP<sup>C</sup> を基準として相対的に比較した場合、殆どの遺伝子の発現量は少なく、前述の 11 遺伝子のうちの 6 遺伝子は比較的高発現の傾向にあった。また、個体接種した場合の 1 例 (図 2) を比較すると、脾臓の 10 日および 30 日目後に Nup43 あるいは Ppp1Cb の高発現が認められるものの、細胞レベルでの結果と密接な関連があるとは考えられなかった。

表 1 に示した 6 遺伝子および Npdc1(neural proliferation, differentiation and control 1, 神経細胞の増殖分化を制御する)、Ugcg(glucosylceramide synthase, スフィンゴ糖脂質合成経路の最初のステップでセラミドにグルコースを転移する酵素)を ScN2a-5 細胞にトランスフェクトしてその PrP<sup>Sc</sup> 蓄積に対する効果を調べた。siRNA 導入後の各々の mRNA を定量したところ、発現量はほぼ 60%以下に減少する一方、PrP<sup>C</sup>mRNA の量は 80~110%の範囲に維持されていた。また、無処置群と比較して、ScN2a-5 細胞の増殖率は Npdc1 および Ugcg siRNA を添加した時に上昇したものの、不変か(Afg3l1 および Nup43, Sdf2l1)かむしろ低下する(Cdca3 および Ppp1cb, Surf4)傾向にあった。この条件下で細胞あたりの PrP<sup>Sc</sup> 蓄積相対量を測定・算出したところ、コントロールの 70%に減少する Ugcg を除いては、siRNA をトランスフェクト後に逆に 120~150%に増加していた (図 3)。Ugcg siRNA をトランスフェクトした場合、図 4 のように ScN2a-5 細胞では Npdc1 以外の 6 遺伝子の発現が高くなっていることが判明した。

## D. 考察

今回の実験では、これまでのプロファイリ

ングをもとに、プリオン感染あるいは治療に伴って発現の変動する遺伝子を詳細に検証するために個体レベルの接種実験及び細胞レベルでの再感染実験で任意の 37 遺伝子の mRNA を定量した。PrP<sup>Sc</sup>の増幅に伴う生体側の反応であっても、該当細胞内に限定される場合と周辺の様々な細胞を含む環境とでは大きな相違がありそれが反映されると考えられる。むしろ、細胞の再感染実験で発現が強くなる Nup43 および Ppp1cb が、個体接種実験の脾臓（10 および 30 日目）でも同様であることに注目すべきかもしれない。

本来は再感染実験と同じ系で siRNA トランスフェクションによる特定遺伝子の発現抑制とその PrP<sup>Sc</sup>蓄積への影響を検討すべきであるが、樹立されたプリオン高感受性クローン ScN2a-5 における PrP<sup>Sc</sup>蓄積の増強が基本的には感染と同様の機構に依存していることを前提に、今回は ScN2a-5 を利用した。その結果、プロファイリングから選択された 6 遺伝子ではなく、任意に用いた Ugcg 遺伝子でのみ PrP<sup>Sc</sup>の蓄積の抑制が検出された。6 遺伝子は、siRNA による発現の抑制の結果、細胞増殖は低下する傾向にあるにもかかわらず、相対的 PrP<sup>Sc</sup>の蓄積量は増加した。Ugcg 遺伝子の発現を抑制した際には、機構は全く不明であるがその他の 6 遺伝子の発現が高くなっていることが判明している。これらの遺伝子（産物）は、凝集化した PrP<sup>Sc</sup>を反応可能な状態に触媒する可能性が考えられるものの、異常タンパク反応、あるいはシャペロン活性化、小胞体関連分解など、たんぱく質の品質管理や細胞内輸送に関連する機能を持つと考えられており、PrP<sup>Sc</sup>が増幅されつつある細胞内での生体側の反応として矛盾しないとも言える。これらの分子がプリオン感染初期に特徴的でバイオマーカーとしての可能性を持つか、また、強制発現により PrP<sup>C</sup>から PrP<sup>Sc</sup>への構造変換・増幅、およびその抑制・阻害に関与するか興味深い。

## E. 結論

37 候補遺伝子を対象にプリオン感染に伴う発現変動を定量的に解析したが、細胞レベルと個体接種で得られた結果の間に密接な関連は見られなかった。細胞レベルでの感染時に高発現を示した 6 遺伝子は、その発現を抑制すると ScN2a-5 の PrP<sup>Sc</sup>増殖を促進する傾向を示した。逆に間接的に発現が促進されると PrP<sup>Sc</sup>増殖が抑制されたことから、これらの遺伝子（産物）が、たんぱく質の品質管理や細胞内輸送に関連する機能を持つことと矛盾しないと考えられた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Miyoshi I, Okamura T, Kasai N, Kitamoto T, Ichikawa S, Osuka S, Hirabayashi Y. Conventional/ Conditional Knockout Mice. In: Hirabayashi Y, Igarashi Y, Merrill AH Jr. ed: Sphingolipid Biology. Springer-Verlag, Tokyo, 2006:443-452.
2. Mototani Y, Miyoshi I, Okamura T, Moriya T, Meng Y, Pei XY, Kameo S, Kasai N. Phenotypic and genetic characterization of the Atp7aMo-Tohm mottled mouse : A new murine model of Menkes disease. Genomics 2006;87(2): 191-199.
3. Cho A, Uchio-Yamada K, Torigai T, Miyamoto T, Miyoshi I, Matsuda J, Kurosawa T, Kon Y, Asano A, Sasaki N, Agui T. Deficiency of the tensin2 gene in the ICGN mouse, an animal model for congenital nephrotic syndrome. Mamm Genome 2006;17(5):407-416.
4. Takahashi RI, Kuramochi T, Aoyagi K,

Hashimoto S, Miyoshi I, Kasai N,  
Hakamata Y, Kobayashi E, Ueda M.  
Establishment and Characterization of  
CAG/EGFP transgenic rabbit line.  
Transgenic Res 2007;16(1):115-120.

2. 学会発表  
なし  
H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

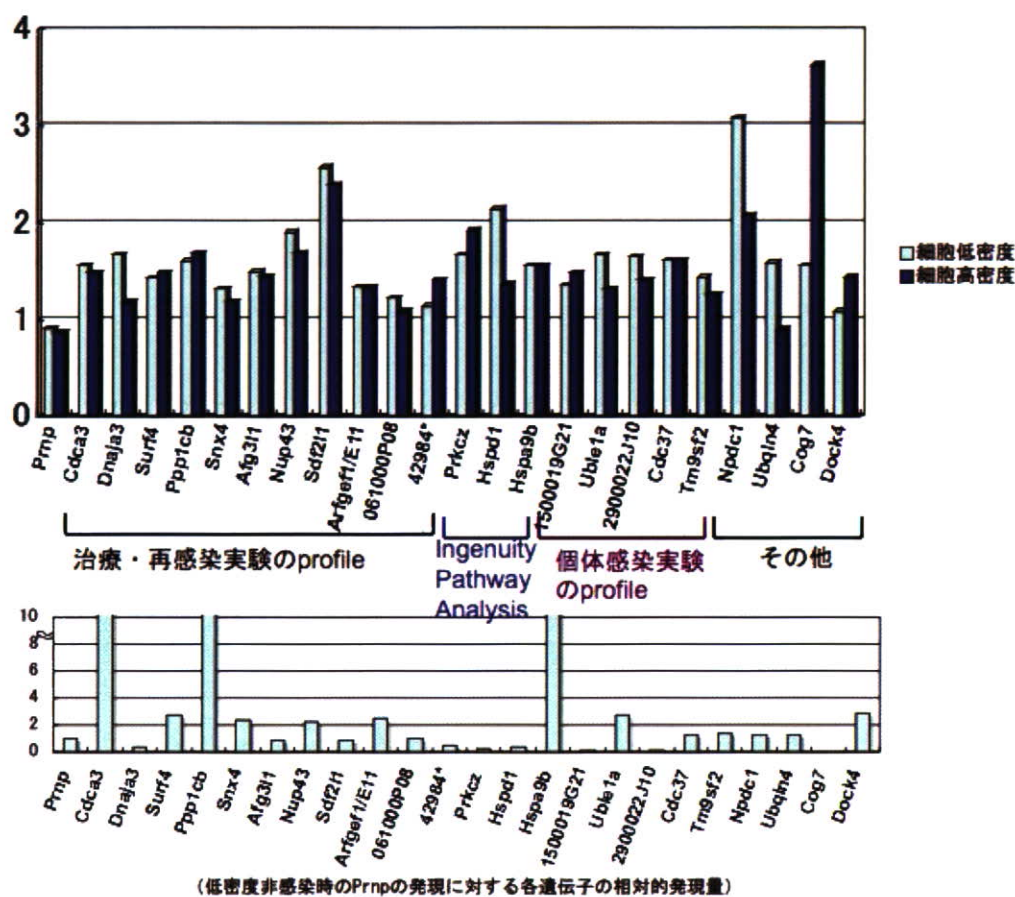


図 1. 細胞密度非依存的に感染・非感染で発現に差があった遺伝子

感染あるいは非感染細胞の間で発現の変動を示す 11 遺伝子、および、Ingenuity Pathway Analysis によってそれらとの相互作用が示唆される遺伝子、個体接種実験で選択された遺伝子などの中から任意に選び出した 37 遺伝子について、再感染させた後、細胞濃度を変えて継代した細胞から抽出した RNA をテンプレートとし TaqMan probe 用い Real time-PCR を実施した

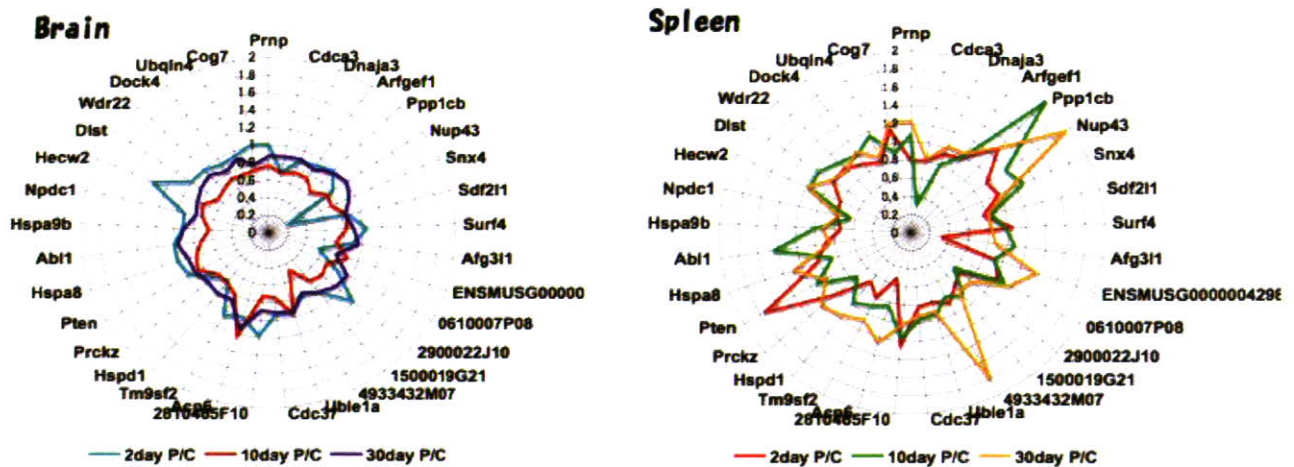


図 2. プリオン接種後に発現する遺伝子の定量的解析

図 1. と同様に 37 遺伝子について、福岡 1 株(P)あるいは正常脳(C)10%乳剤を C57BL/6 マウスの脳および腹腔内に接種し、2 及び 10、30 日後に採取した脾臓、脳等から抽出した RNA をテンプレートとし TaqMan probe 用い Real time-PCR を実施した

表 1. 再感染実験で変動を示した遺伝子

stromal cell-derived factor 2-like 1(Sdf2l1) : O-mannosyltransferase活性を有する Pmt/rt protein family memberの一つでUPR pathwayで誘導され、DnaK Cochaperone と相互作用。

nucleoporin 43(Nup43) : mRNAやタンパクの輸送に関与する核膜孔複合体を形成すると考えられている nucleoporinの一つ。

protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform(Ppp1cb) : セリン・スレオニンフォスファターゼの一つで、ポリグルタミンを含むペプチドの分解に関与か？。

AFG3(ATPase family gene 3)-like 1 (yeast)(Afg3l) : ATP-dependent zinc metalloprotease familyと高いホモログを示すタンパクをコードする。ミトコンドリアに局在する。

surfeit gene 4(Surf4):SURF4 family memberでこの酵母のホモログはER-Golgi輸送において、小胞を形成および小胞輸送に関与している。

cell division cycle associated 3(Cdca3) : cell cycleを制御、ユビキチン化に関与。